

UNIVERSIDAD DE GRANADA

T  
11  
137

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUÍMICA



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ..6-5-94.....  
ENTRADA NUM. ...690.....

Tesis Doctoral

**Crecimiento Mixotrófico de *Chlorella pyrenoidosa*  
en un Fotobiorreactor Discontinuo**

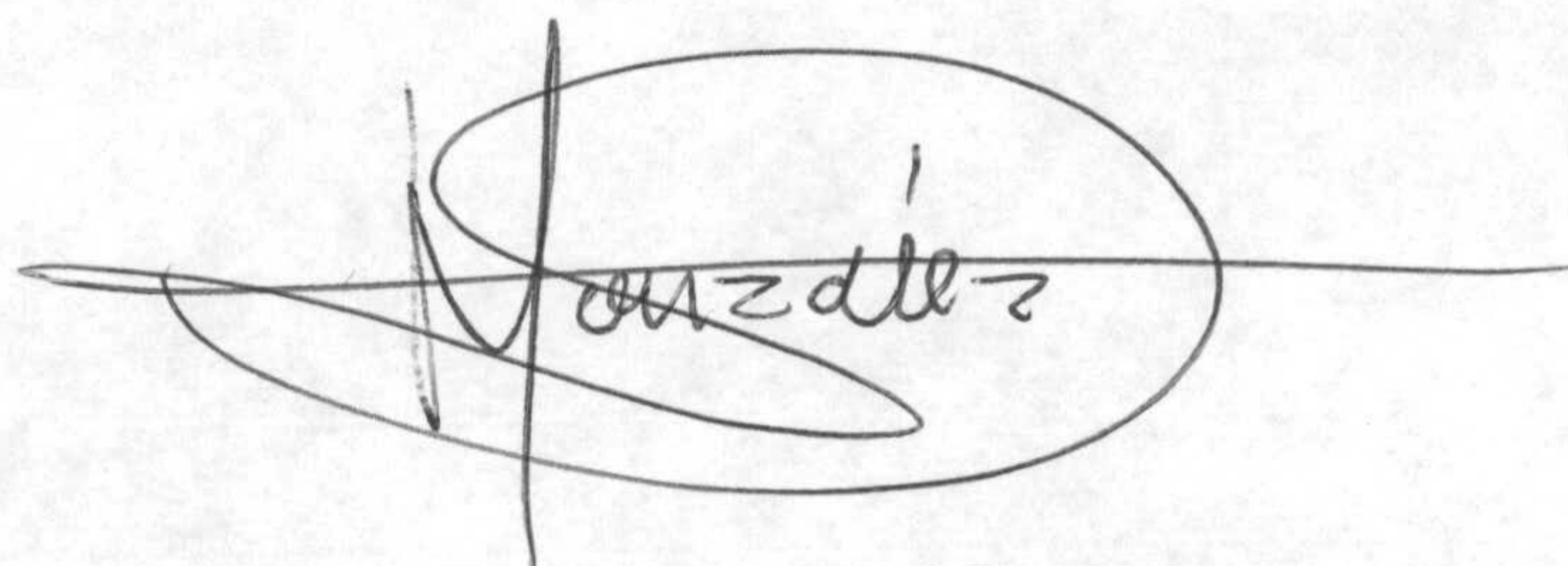
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
Nº Documento 619675872  
Nº Copia 121222356

Mayo, 1994

Juan B. Espínola Lozano

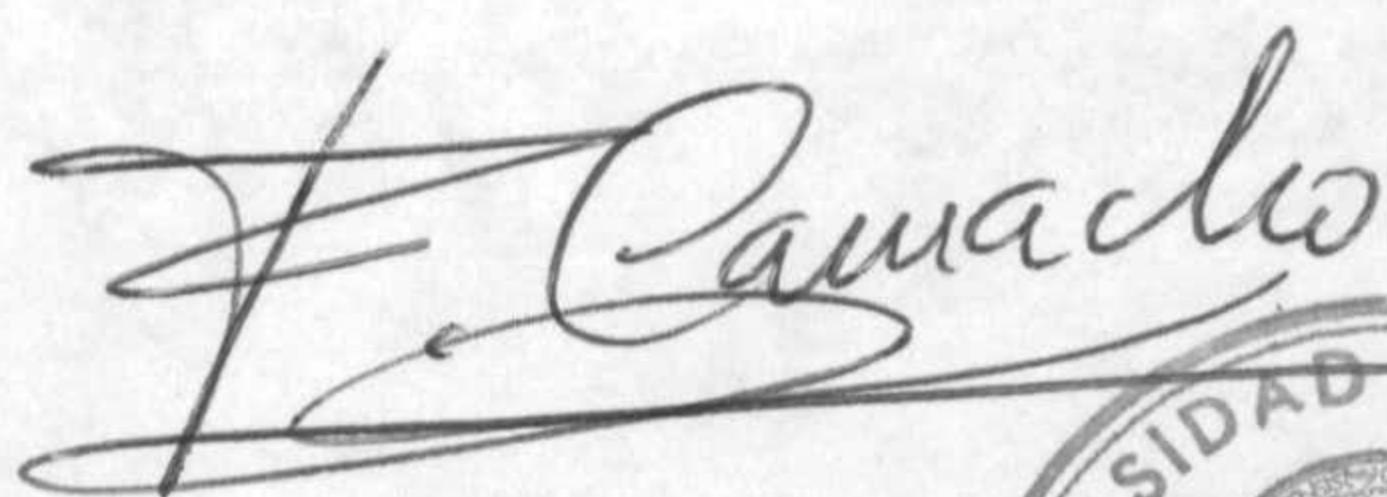
**PEDRO GONZÁLEZ TELLO, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR  
DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUIÍMICA**

**CERTIFICO:** Que el presente trabajo sobre "**Crecimiento Mixotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* en un Fotobiorreactor Discontinuo**" ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento en Granada , bajo la dirección del **Prof. Dr. D. Fernando Camacho Rubio** y de la **Prof. Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Eugenia Martínez Sancho**, por el Lcdo. **Juan Bautista Espínola Lozano** para aspirar al grado de Doctor en Ciencias, Sección de Químicas.

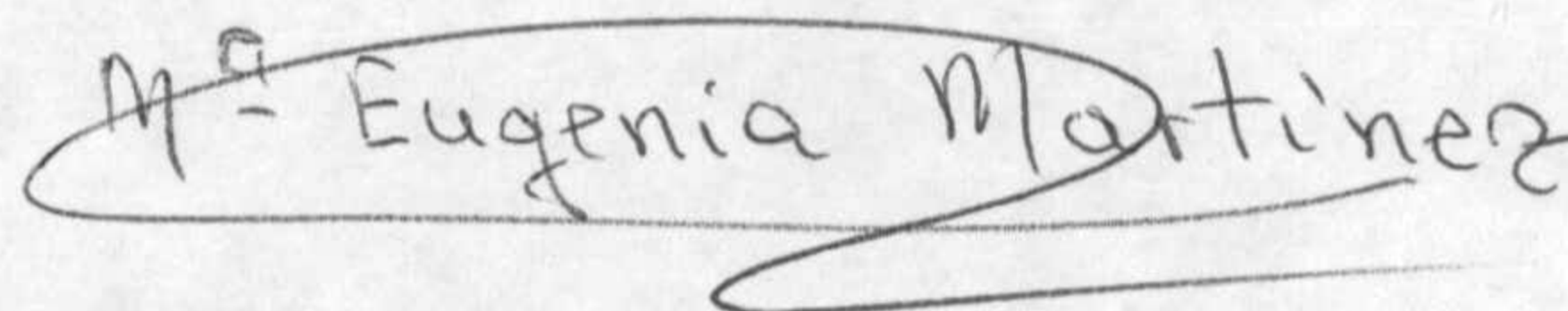


Granada, 5 de Mayo de 1994

Los Directores de la Memoria



Fdo. Fernando Camacho Rubio



Fdo. M<sup>a</sup> Eugenia Martínez Sancho



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A los Profesores Drs. D. Fernando Camacho Rubio y D<sup>a</sup> María Eugenia Martínez Sancho, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, por su inestimable ayuda y acertada dirección en la realización de esta Memoria.

Al Prof. Dr. D. Jose Manuel Jiménez Castillo por su importante colaboración en la realización de este trabajo.

Al Lcdo. Juan Santamarina Urbano por su ayuda en la ejecución de algunos experimentos.

A los miembros del Departamento de Ingeniería Química que de alguna manera han contribuido a la realización de este Trabajo.

A Josefina por su paciencia y comprensión.

*F. Espinola*  
*1944*

Juan B. Espinola Lozano.

ÍNDICE

<b>1 RESUMEN</b>	.....	1.1
<b>2 INTRODUCCIÓN</b>	.....	2.1
<b>2.1 INTERÉS DEL CULTIVO DE ALGAS UNICELULARES</b>	.....	2.2
<b>2.1.1 USO DE LAS ALGAS EN ALIMENTACIÓN</b>	.....	2.2
<b>2.1.1.1 Composición química de la biomasa</b>	.....	2.4
<b>Proteínas</b>	.....	2.4
<b>Aminoácidos</b>	.....	2.5
<b>Lípidos</b>	.....	2.7
<b>Vitaminas</b>	.....	2.7
<b>Hidratos de Carbono</b>	.....	2.9
<b>2.1.1.2 Calidad de la proteína</b>	.....	2.10
<b>2.1.1.3 Aspectos toxicológicos</b>	.....	2.12
<b>Ácidos nucleicos</b>	.....	2.12
<b>Contaminación</b>	.....	2.12
<b>2.1.2 EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES</b>	.....	2.13
<b>2.1.3 DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES</b>	.....	2.14
<b>2.1.4 LAS ALGAS COMO FUENTE DE ENERGÍA</b>	.....	2.18
<b>2.2 TIPOS DE CRECIMIENTO</b>	.....	2.19
<b>2.2.1 CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO</b>	.....	2.20
<b>2.2.2 CRECIMIENTO HETEROTRÓFICO</b>	.....	2.21

2.2.3	CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO	.....	2.27
2.2.4	CRECIMIENTO FOTOHETEROTRÓFICO	.....	2.35
2.2.5	CRECIMIENTO ANAEROBIO	.....	2.36
<b>2.3</b>	<b>PROCESOS BIOLÓGICOS</b>	.....	<b>2.39</b>
2.3.1	FOTOSÍNTESIS	.....	2.39
2.3.1.1	Pigmentos	.....	2.40
2.3.1.2	Utilización de la energía luminosa	.....	2.41
2.3.1.3	Asimilación de CO <sub>2</sub> .Fotosíntesis de hidratos de carbono	.....	2.44
2.3.1.4	Inhibición de la fotosíntesis	.....	2.45
2.3.2	METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS	.....	2.49
	Metabolismo de la glucosa	.....	2.49
	Sistema EMP	.....	2.49
	Sistema HMP	.....	2.52
	Metabolismo Anaerobio	.....	2.54
	Metabolismo de ácidos y alcoholes	.....	2.56
<b>2.4</b>	<b>INFLUENCIA DEL PH</b>	.....	<b>2.60</b>
2.4.1	CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO	.....	2.61
2.4.2	CRECIMIENTO HETEROTRÓFICO	.....	2.62
2.4.3	CRECIMIENTO ANAEROBIO	.....	2.62

2.4.4	CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO	.....	2.63
2.5	INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	.....	2.64
2.6	CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE ALGAS UNICELULARES	.....	2.69
2.6.1	MODELOS CINÉTICOS	.....	2.70
2.6.1.1	Influencia de la concentración de sustratos disueltos sobre el crecimiento	.....	2.70
	Modelos de limitación por sustrato	.....	2.72
	Modelos de inhibición por sustrato	.....	2.74
	Modelos de toxicidad del sustrato	.....	2.76
2.6.1.2	Influencia de la intensidad de iluminación.	.....	2.77
	Modelo discontinuo	.....	2.77
	Modelo hiperbólico	.....	2.78
	Modelo exponencial	.....	2.78
2.7	RENDIMIENTO	.....	2.79
2.7.1	RENDIMIENTO MÁSIKO O MOLAR	.....	2.80
2.7.2	RENDIMIENTO ENERGÉTICO	.....	2.80
2.7.3	RENDIMIENTO BIOENERGÉTICO	.....	2.81
2.7.3.1	Crecimiento autotrófico	.....	2.81
2.7.3.2	Crecimiento fotoheterotrófico y mixotrófico	.....	2.84

<b>2.8 OBJETO DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN</b>	.....2.86
<b>3 TÉCNICA EXPERIMENTAL</b>	.....3.1
<b>3.1 DESCRIPCIÓN DE LA INSTALACIÓN</b>	.....3.2
3.1.1 SUMINISTRO DE AIRE	.....3.2
3.1.2 SUMINISTRO DE NITRÓGENO	.....3.4
3.1.3 SUMINISTRO DE DIÓXIDO DE CARBONO	.....3.4
3.1.4 DISTRIBUIDOR DE GASES	.....3.4
3.1.5 VASOS DE CULTIVO	.....3.5
3.1.6 AGITACIÓN	.....3.5
3.1.7 CIRCUITO DE TERMOSTATACIÓN	.....3.6
3.1.8 ILUMINACIÓN	.....3.6
<b>3.2 PROCEDIMIENTO</b>	.....3.8
3.2.1 MICROALGA UTILIZADA	.....3.8
3.2.2 CONSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS DE ALGAS	.....3.8
3.2.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	.....3.9
3.2.4 PRECULTIVO	.....3.12
3.2.5 PREPARACIÓN DEL INÓCULO LÍQUIDO	.....3.12
3.2.6 INOCULACIÓN DE LOS VASOS DE CRECIMIENTO	.....3.12



<b>3.3 MEDIDA DE CAUDALES.</b>	.....	3.14
<b>3.4 DETERMINACIÓN DE LA INTENSIDAD INICIAL DE ILUMINACIÓN ....</b>		3.19
3.4.1 MEDIDOR	.....	3.19
3.4.2 CALIBRADO FOTOCÉLULAS	.....	3.19
3.4.3 INTENSIDAD MEDIA POR SECCIONES	.....	3.27
3.4.4 INTENSIDAD MEDIA GLOBAL	.....	3.27
<b>3.5 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO</b>	.....	3.32
3.5.1 DETERMINACIÓN DE LA ABSORBANCIA DE LA SUSPENSIÓN ..		3.32
3.5.2 DETERMINACIÓN DEL PESO SECO DE CÉLULAS	.....	3.32
3.5.3 CONTAJE CELULAR	.....	3.36
<b>3.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CLOROFILA</b>	.....	3.37
<b>3.7 DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA.</b>	.....	3.40
3.7.1 MÉTODO SOMOGYI-NELSON	.....	3.40
3.7.2 MÉTODO DEL ÁCIDO DINITROSALICÍLICO	.....	3.43

<b>4 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN.....</b>	<b>4.1</b>
<b>4.1 INFLUENCIA DEL PH .....</b>	<b>4.3</b>
<b>4.1.1 CRECIMIENTO FOTOHETEROTRÓFICO .....</b>	<b>4.3</b>
<b>4.1.1.1 Influencia de la concentración de sustrato orgánico .....</b>	<b>4.8</b>
<b>4.1.2 CRECIMIENTO ANAEROBIO .....</b>	<b>4.11</b>
<b>4.1.3 CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO .....</b>	<b>4.14</b>
<b>4.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA .....</b>	<b>4.18</b>
<b>5 RESULTADOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>5.1</b>
<b>5.1 CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO .....</b>	<b>5.2</b>
<b>5.2 CRECIMIENTO FOTOHETEROTRÓFICO .....</b>	<b>5.23</b>
<b>5.3 CRECIMIENTO ANAEROBIO .....</b>	<b>5.34</b>
<b>5.4 INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE DCMU .....</b>	<b>5.39</b>
<b>5.5 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL SUSTRATO .....</b>	<b>5.45</b>

<b>6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	.....6.1
<b>6.1 CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO</b>	.....6.2
6.1.1 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO	.....6.2
6.1.1.1 <b>Zona exponencial de crecimiento mixotrófico.</b>	..... 6.3
6.1.1.1.1 Influencia de la concentración de glucosa	.....6.8
6.1.1.1.2 Influencia de la intensidad de iluminación	.....6.11
6.1.1.2 <b>Zona de crecimiento exponencial autotrófico</b>	.....6.13
6.1.1.3 <b>Comparación de resultados</b>	.....6.18
6.1.2 CONTENIDO EN CLOROFILA	.....6.20
6.1.2.1 <b>Zona de crecimiento exponencial mixotrófico</b>	.....6.33
6.1.3 CONSUMO DE SUSTRATO	.....6.39
6.1.3.1 <b>Velocidad específica de consumo de sustrato</b>	.....6.39
6.1.4 RENDIMIENTO	.....6.48
6.1.4.1 <b>Rendimiento en biomasa</b>	.....6.48
6.1.4.2 <b>Estudio estequiométrico</b>	.....6.61
6.1.4.3 <b>Rendimiento bioenergético</b>	.....6.64
<b>6.2 CRECIMIENTO FOTOHETEROTRÓFICO</b>	.....6.70
6.2.1 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA	.....6.70

6.2.2 INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE ILUMINACIÓN	.....6.76
6.2.3 CONTENIDO EN CLOROFILA	.....6.78
6.2.4 CONSUMO DE SUSTRATO	.....6.90
6.2.4.1 <b>Velocidad específica de consumo de sustrato</b>	.....6.90
6.2.5 RENDIMIENTO	.....6.97
6.2.5.1 <b>Rendimiento en biomasa</b>	.....6.97
6.2.5.2 <b>Estudio estequiométrico</b>	.....6.104
6.3 <b>CRECIMIENTO ANAEROBIO</b>	.....6.105
6.3.1 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA	.....6.105
6.3.2 CONTENIDO EN CLOROFILA	.....6.108
6.3.3 CONSUMO DE SUSTRATO	.....6.114
6.3.3.1 <b>Velocidad específica de consumo de sustrato</b>	.....6.114
6.3.4 RENDIMIENTO	.....6.120
6.3.4.1 <b>Rendimiento en biomasa</b>	.....6.120
6.4 <b>INFLUENCIA DEL INHIBIDOR DCMU</b>	.....6.124
6.5 <b>INFLUENCIA DEL PH</b>	.....6.127

6.5.1 VELOCIDADES ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO	6.127
6.6 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	6.132
6.7 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL SUSTRATO ORGÁNICO	6.137
6.7.1 ACETATO	6.137
6.7.1.1 Influencia de la concentración de acetato	6.137
6.7.1.2 Influencia del tipo de crecimiento	6.146
6.7.2 ETANOL	6.147
6.7.2.1 Influencia del tipo de crecimiento	6.147
7 CONCLUSIONES	7.1
8 NOMENCLATURA	8.1
9 BIBLIOGRAFÍA	9.1

# 1. RESUMEN

El trabajo que se describe en esta Memoria pertenece a una línea de investigación del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada sobre "Cinética del crecimiento de algas unicelulares".

Las algas unicelulares no solo crecen en condiciones autotróficas sino que muchas especies son capaces de utilizar sustratos orgánicos para la biosíntesis y para el mantenimiento celular, pudiéndose además incrementar de esta forma el rendimiento de un cultivo en condiciones de limitación por la luz. Por tanto, el estudio experimental del crecimiento mixotrófico de algas tiene gran interés en la actualidad con la finalidad de aumentar la producción de proteínas, mejorar el tratamiento de aguas residuales mediante los sistemas algas-bacterias y obtener determinadas biomoléculas de interés industrial.

En esta Memoria se describen los resultados obtenidos sobre la cinética y el rendimiento del cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* en condiciones mixotróficas: disponibilidad de un sustrato orgánico, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y luz; en condiciones fotoheterotróficas: disponibilidad de un sustrato orgánico O<sub>2</sub> y luz; y en condiciones anaerobias: disponibilidad de sustrato orgánico y luz. En estos tipos de crecimiento se ha analizado la influencia de la temperatura, pH, concentración inicial de sustrato orgánico, intensidad inicial de iluminación y de la presencia del inhibidor de la fotosíntesis, DCMU.

La velocidad específica máxima de crecimiento,  $\mu_m$ , de *Chlorella pyrenoidosa*, con glucosa como sustrato orgánico, en condiciones mixotróficas, fotoheterotróficas y anaerobias ha resultado ser la misma, con un valor medio de 0.106 h<sup>-1</sup>, e independiente de la concentración de sustrato orgánico y de la intensidad de iluminación en los intervalos investigados a 30 °C y pH = 6.5. Este resultado sugiere que  $\mu_m$  está determinada solo por la posibilidad de utilizar el sustrato orgánico como fuente de carbono y la luz para el mantenimiento celular.

En condiciones de cultivo mixotróficas, una vez consumido el sustrato orgánico y tras un período de adaptación, las células crecen a velocidades equivalentes a las de un cultivo autotrófico, lo que indica que el período mixotrófico inicial no ha deteriorado de manera irreversible el aparato fotosintético de las células. Aunque la velocidad de crecimiento en el período mixotrófico es generalmente superior a la del período autotrófico posterior, ambas tienden a igualarse al aumentar la intensidad de iluminación, lo que implica que a altas intensidades de iluminación no se obtiene ningún beneficio en el cultivo por la adición de un sustrato orgánico.

El contenido en clorofila por unidad de peso seco de células crece continuamente con el tiempo cuando el cultivo tiene lugar en condiciones mixotróficas, mientras que permanece prácticamente constante en condiciones fotoheterotróficas y anaerobias, resultado que sugiere que la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  es esencial para que las células intensifiquen la síntesis de clorofila.

La velocidad específica de consumo de sustrato orgánico,  $q_s$ , resulta ser independiente de la concentración del mismo, si bien en cultivo mixotrófico aumenta claramente al disminuir la intensidad de iluminación. Por otra parte, esta magnitud aumenta con las condiciones de cultivo en el sentido:

*mixotrófico* → *fotoheterotrófico* → *anaerobio*

tendiendo al valor de 365 mg glucosa/g. biomasa h. determinado previamente en nuestros laboratorios en cultivo heterotrófico.

El rendimiento global biomasa/sustrato correspondiente a todo el período mixotrófico resulta depender de la concentración inicial de glucosa y para



cada una de ellas varia con la intensidad inicial de iluminación en la forma:

$$Y = \frac{\alpha + \beta I_o}{K + I_o}$$

tendiendo a un valor constante de  $\alpha/K$  de 0.33, independiente de la concentración de glucosa, a bajas intensidades de iluminación, que coincide prácticamente con el correspondiente al cultivo heterotrófico.

Los rendimientos instantáneos,  $Y_s$ , calculados utilizando los valores determinados por análisis de la concentración de biomasa y sustrato orgánico en función del tiempo, son independientes de la concentración de glucosa, aumentan con la intensidad de iluminación y a un mismo valor de ésta disminuyen con las condiciones de cultivo en el sentido:

*mixotrófico → fotoheterotrófico → anaerobio*

estando siempre comprendidos entre el valor de 1.24 correspondiente a altas intensidades de iluminación en cultivo mixotrófico y 0.33 correspondiente al cultivo heterotrófico.

La comparación de los rendimientos instantáneos con las velocidades específicas de consumo de sustrato orgánico pone de manifiesto que en condiciones mixotróficas:

$$Q_s < \frac{1}{Y_s} \mu_m$$

aunque ambos términos tienden a igualarse al disminuir la intensidad de iluminación, lo que sugiere que en estas condiciones la luz se utiliza para el mantenimiento celular y también en parte para la fijación de CO<sub>2</sub>.

En condiciones fotoheterotróficas ha resultado que

$$Q_s = \frac{1}{Y_s} \mu_m$$

es decir, que la luz se utiliza fundamentalmente para el mantenimiento celular.

En condiciones anaerobias ha resultado que:

$$Q_s > \frac{1}{Y_s} \mu_m$$

lo que sugiere que el sustrato orgánico se invierte también en el mantenimiento celular.

La presencia del inhibidor de la fotosíntesis DCMU a la máxima intensidad de iluminación en condiciones mixotróficas y anaerobias da una velocidad máxima de crecimiento de 0.073 h<sup>-1</sup>, apreciablemente inferior al valor obtenido en su ausencia. El valor indicado anteriormente coincide prácticamente con el correspondiente al cultivo heterotrófico, lo que indica que la presencia de

este inhibidor impide la utilización de la luz tanto para la fijación del CO<sub>2</sub> como para el mantenimiento celular. Este resultado se confirma con el rendimiento biomasa/sustrato que ha resultado en todos los experimentos muy próximo al valor de 0.33 correspondiente al cultivo heterotrófico.

La influencia del pH sobre la velocidad específica de crecimiento ha resultado semejante para todas las condiciones de cultivo investigadas: mixotróficas, fotoheterotróficas y anaerobias, presentando un valor máximo para pH 6.5 y ajustándose los resultados obtenidos en las proximidades de este óptimo a la ecuación

$$\mu = \frac{\mu_o}{1 + \frac{a}{[H^+]} + b[H^+]^2}$$

La influencia de la temperatura sobre  $\mu_m$  ha resultado también independiente de las condiciones de cultivo en el intervalo de 25 a 35 °C presentando un máximo a 30°C y puede representarse de manera aproximada por la ecuación de Moser.

$$\mu_m = \mu_a \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) - \mu_d \exp\left(\frac{-E_d}{RT}\right)$$

La utilización de otros sustratos orgánicos : acetato y etanol, pone de manifiesto que la naturaleza del sustrato orgánico no influye de manera apreciable sobre  $\mu_m$ . De igual forma que en el cultivo heterotrófico, con acetato

en cultivo mixotrófico se observa inhibición de sustrato, aunque en estas últimas condiciones la velocidad específica de crecimiento es mayor y la inhibición se detecta a concentraciones más altas. De forma semejante mientras que en el cultivo heterotrófico sobre etanol no se produce crecimiento éste si tiene lugar en condiciones mixotróficas, lo que sugiere que en presencia de luz se sintetizan enzimas necesarias para la asimilación de este sustrato.

## 2 INTRODUCCIÓN

## 2.1 INTERES DEL CULTIVO DE ALGAS UNICELULARES

El interés por los cultivos de algas a escala industrial surgió a raíz de la publicación en 1953 de la monografía "Algal Culture from Laboratory To Pilot Plant" Burlew (1953) que resumía todas las investigaciones realizadas hasta entonces.

Actualmente este interés se basa en la gran variedad de aplicaciones de las mismas: Uso en alimentación, extracción de productos comerciales, tratamiento de aguas residuales, bioconversión de la energía solar etc. Pudiéndose hacer uso de varias de estas aplicaciones en un único proceso global, Figura 2.1 Goldman (1980).

### 2.1.1 USO DE LAS ALGAS EN ALIMENTACION

Historicamente la cianobacteria *Spirulina* se consumía por los Aztecas en el antiguo México. Actualmente tanto *Spirulina* como otras especies de algas, fundamentalmente marinas, se adicionan a alimentos elaborados, especialmente en los países asiáticos. Entre los criterios para valorar la potencialidad de un alga como fuente de alimentación deben considerarse los siguientes:

- Composición química de la biomasa
- Calidad de la proteína
- Aspectos toxicológicos

## APLICACIONES DE LOS CULTIVOS MASIVOS DE ALGAS

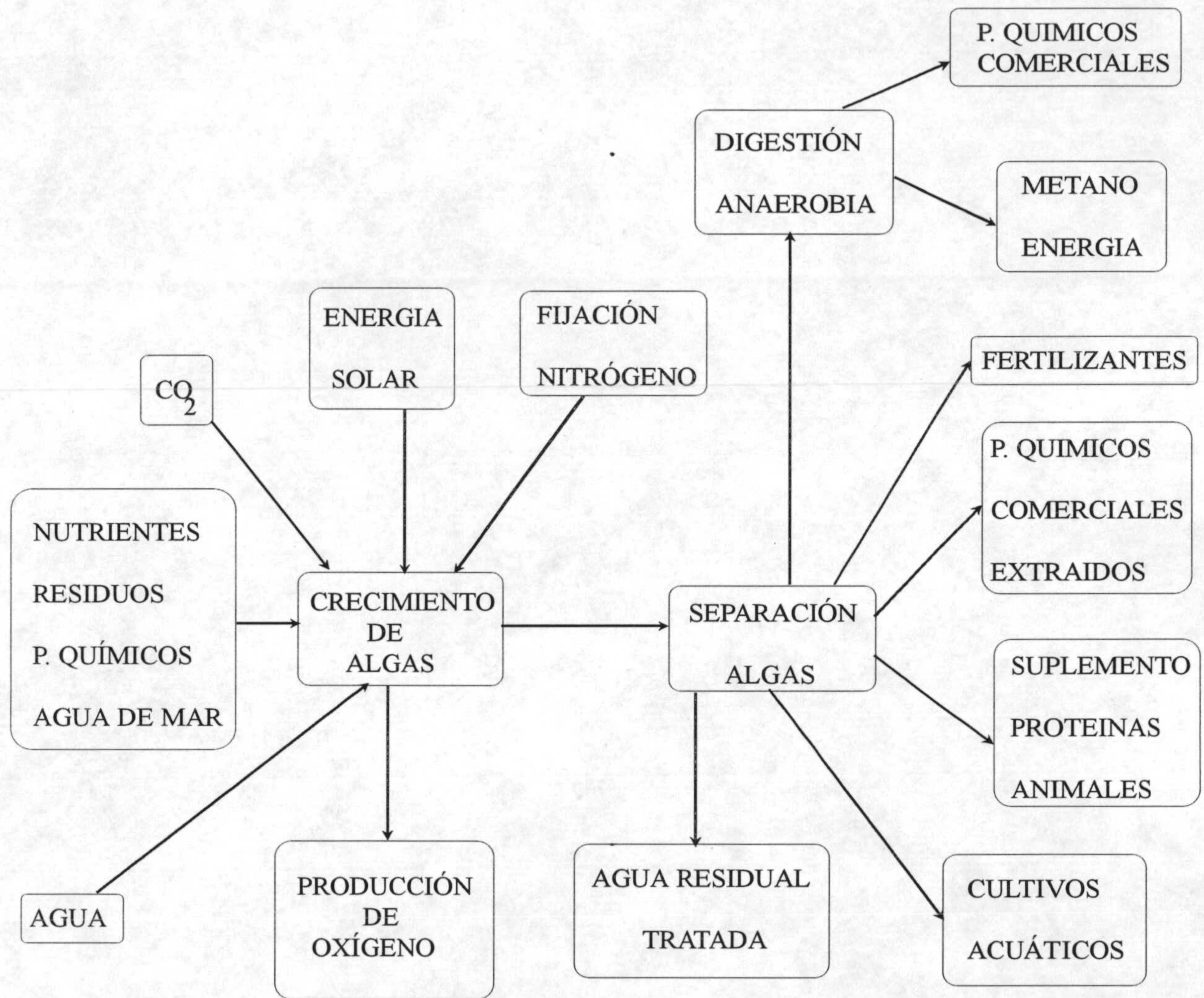


Figura 2.1

### 2.1.1.1 Composición química de la biomasa

La composición química de las microalgas aporta información básica sobre el potencial nutritivo de su biomasa.

Esta composición puede modificarse con relativa facilidad según sean las condiciones del medio ambiente, como:

- riqueza en nitrógeno y fósforo
- presión osmótica
- intensidad de radiación

y parámetros fisiológicos como:

- edad media
  - densidad de población
- Spoehr y Milner (1949).

En la Tabla 2.1 se recoge la composición en proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, expresada en % en peso sobre el total de biomasa seca, de diferentes algas.

#### *Proteínas*

El alto contenido en proteínas de las microalgas, superior al 50% en peso seco, es una de las razones de la selección de estos organismos como fuente de alimentación.

Con la Tabla 2.2 se pretende comparar estos porcentajes con el de fuentes tradicionales de proteínas, observándose que solo la harina de pescado llega a tener un contenido superior.



### Aminoácidos

La calidad de las proteínas está determinada por el contenido, proporción y accesibilidad de sus aminoácidos, Becker (1986).

En la Tabla 2.3 se compara la composición de *Spirulina máxima* y *Chlorella pyrenoidosa* con la del huevo entero y con la proteína de la caseína, Rodríguez (1982), Allinger y col (1974) y Primo (1979)

TABLA 2.1

### COMPOSICION QUIMICA DE DIFERENTES ALGAS

MICROALGA	PROTEINA	LIPIDOS	H.CARBONO	A.NUCLEICOS
<i>Spirulina platensis</i>	46-50	4-9	8-14	2-5 (a)
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16	2.9-4.5 (b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-27	12-17	4-5 (c)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57.0	2.0	26.0	(d)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17	3-6 (e)
<i>Dunaliella salina</i>	57	6.0	32.0	(f)

(a) Tipnis y cols (1960)

(b) Durand-Chastel (1980)

(c) Trubachev y col (1976)

(d) Aaronson y cols (1980)

(e) Soeder C.J.(1980)

(f) Parsons y col (1961)

TABLA 2.2

	Proteínas % en peso
Harina de pescado	60
Levadura de cerveza	48
Harina de semilla de soja	44
Leche desnatada en polvo	36
Trigo	12

TABLA 2.3

AMINOACIDOS ESENCIALES DEL HUEVO ENTERO, CASEINA  
Y DE VARIAS ESPECIES DE MICROALGAS (g en 100 g de proteínas)

Aminoácidos	Huevo entero	Caseina	<i>Spirulina</i> <i>máxima</i>	<i>Chlorella</i> <i>pyrenoidosa</i>
Phe	5.8	3.9	5.2	7.2
Ile	6.6	-	5.8	3.4
Leu	8.8	9.7	8.3	6.0
Lys	4.6	2.6	4.5	4.5
Met	3.1	3.6	1.8	2.0
Thr	5.1	3.9	4.6	5.2
Trp	1.6	2.2	1.1	1.1
Val	7.3	7.9	6.6	6.2

Aunque las algas pueden sintetizar todos los aminoácidos son a menudo deficientes en aquellos que contienen azufre, Leveille y cols (1962). Sin embargo, Soeder (1980) menciona la posibilidad de aislar mutantes de *Spirulina* y *Chlorella* con altos contenidos en metionina.

### *Lípidos.*

Los lípidos de las algas, diferentes según los distintos grupos taxonómicos, son típicamente ésteres de glicerol y ácidos grasos. Casi todos los ácidos grasos encontrados en las algas son de cadena lineal con un número par de átomos de carbono (12-20). Las algas verdes de agua dulce en general contienen pocos ácidos grasos con más de tres dobles enlaces o un número de átomos de carbono superior a 18.

En la Tabla 2.4 se indica la composición en ácidos grasos de diferentes algas. Desde el punto de vista de su uso como fuente de alimentación, es muy importante la presencia de los ácidos grasos esenciales  $\alpha$ -linolenico y  $\gamma$ -linolenico, Becker (1986).

Los triglicéridos son el producto de reserva más común en las algas y pueden llegar a constituir hasta el 80% de la fracción lípida total. Esta fracción a su vez varía desde el 1% hasta por encima del 40% del peso seco.

Los factores ambientales pueden afectar tanto a la cantidad total de lípidos como a la proporción relativa de ácidos grasos en los mismos, Materassi y cols (1980), Piorreck y cols. (1984), Petkov y cols. (1992).

### *Vitaminas.-*

Las algas representan una fuente importante de las principales vitaminas, lo cual mejora las propiedades nutritivas de esta proteína no convencional.

TABLA 2.4

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS EN DIFERENTES ALGAS  
% del total de LIPIDOS

Acidos grasos	<i>Spirulina máxima</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
12:0	0.4	1.8	-
14:0	1.1	2.4	0.9
14:1	-	-	2.0
15:0	-	-	1.6
16:0	33.7	18.0	20.4
16:1	3.0	4.1	5.8
16:2	3.6	3.1	1.7
17:0	0.2	1.1	2.5
18:0	trazas	33.7	15.3
18:1	4.0	10.5	6.6
18:2	22.3	5.3	1.5
$\alpha$ 18:3	0.3	-	20.5
$\gamma$ 18:3	17.9	-	-
20:2	-	-	1.5
20:3	-	13.1	-
otros	14.3	6.9	19.6
referencia	(a)	(b)	(b)

(a) Durand (1980)

(b) Podojil y cols. (1978)

Una comparación de la cantidad media de vitaminas en algas y otros alimentos se refleja en la Tabla 2.5. Estos contenidos, al igual que ocurre en las plantas superiores, dependen de las condiciones de cultivo, Borowitzka (1988).

TABLA 2.5  
CONTENIDO EN VITAMINAS DE DIFERENTES ALGAS Y ALIMENTOS  
(mg/kg peso seco)

	<i>Spirulina</i> <i>máxima</i>	<i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	<i>Chlorella</i> <i>pyrenoidosa</i>	Espinacas	Higado de vaca
Provitamina A	1400	230	480	—	—
Vitamina E	140	—	—	122	10
Tiamina	54	8.2	9.9	4.9	3
Riboflavina	41	36.6	35.9	9.7	290
Piridoxina	3	2.5	22.9	9.7	7
Cobalamina	6	0.4	0.02	—	0.65
Vitamina C	70	20	—	2480	310
Biotina	0.4	0.2	0.15	0.34	1
Pantotenato Ca	11	16.5	20	14.8	73
ref.	(a)	(b)	(c)	(d)	(d)
(a) Hudson y col. (1974)					
(b) Becker (1984)					
(c) Fischer y col. (1953)					
(d) Dien y col. (1975)					

#### *Hidratos de carbono*

El contenido en hidratos de carbono de las algas es de aproximadamente un 20% del peso seco. Para *Spirulina* este valor es del 16%, siendo el 90% ramnosa, 1.5% glucosa y el resto glucosamina y glicógeno, Durand (1980).

En determinadas condiciones de heterotrofismo el contenido en almidón

de *Chlorella* puede llegar a alcanzar valores próximos al 80% de su peso seco.

En *Euglena*, se han identificado, maltosa, sacarosa y trihalosa.

#### 2.1.1.2 Calidad de la proteína

Aunque la composición química de un alga proporciona una gran información concerniente a su calidad nutritiva, no es suficiente para decidir su aplicabilidad y es necesario realizar también ensayos de nutrición "in vivo" para determinar su valor biológico.

El valor nutritivo depende además en gran medida del procesado de la biomasa una vez separadas las células del medio de cultivo.

Con excepción de *Spirulina*, la mayor parte de las microalgas tienen una pared celular relativamente fuerte y rígida, lo que hace que no puedan ser digeridas por los no rumiantes. Si la biomasa se va a utilizar en la alimentación humana o de animales monogástricos, la pared celular debe romperse, bien por métodos químicos (lisis inducida por butanol, ruptura de enlaces hidrógeno con fenol, ácido fórmico o urea); o mediante métodos físicos (ebullición, o secado por diversos métodos). El problema principal de los tratamientos químicos es la necesidad de recuperar el agente empleado y asegurar que el producto final no es tóxico.

En la Figura 2.2 se muestran los resultados obtenidos por Pabst (1978), que determina el valor nutritivo de algunas microalgas tratadas por métodos físicos y el de proteínas convencionales, experimentando en ratas.

La figura muestra que la caseína enriquecida con metionina es una proteína fácilmente digerible de muy alta calidad. Los resultados para las tres especies de algas son semejantes, se aproximan a los de la harina de pescado y están al mismo nivel que la soja. Sin embargo, con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la asimilación es significativamente menor.

### Utilizacion de proteina ingerida %

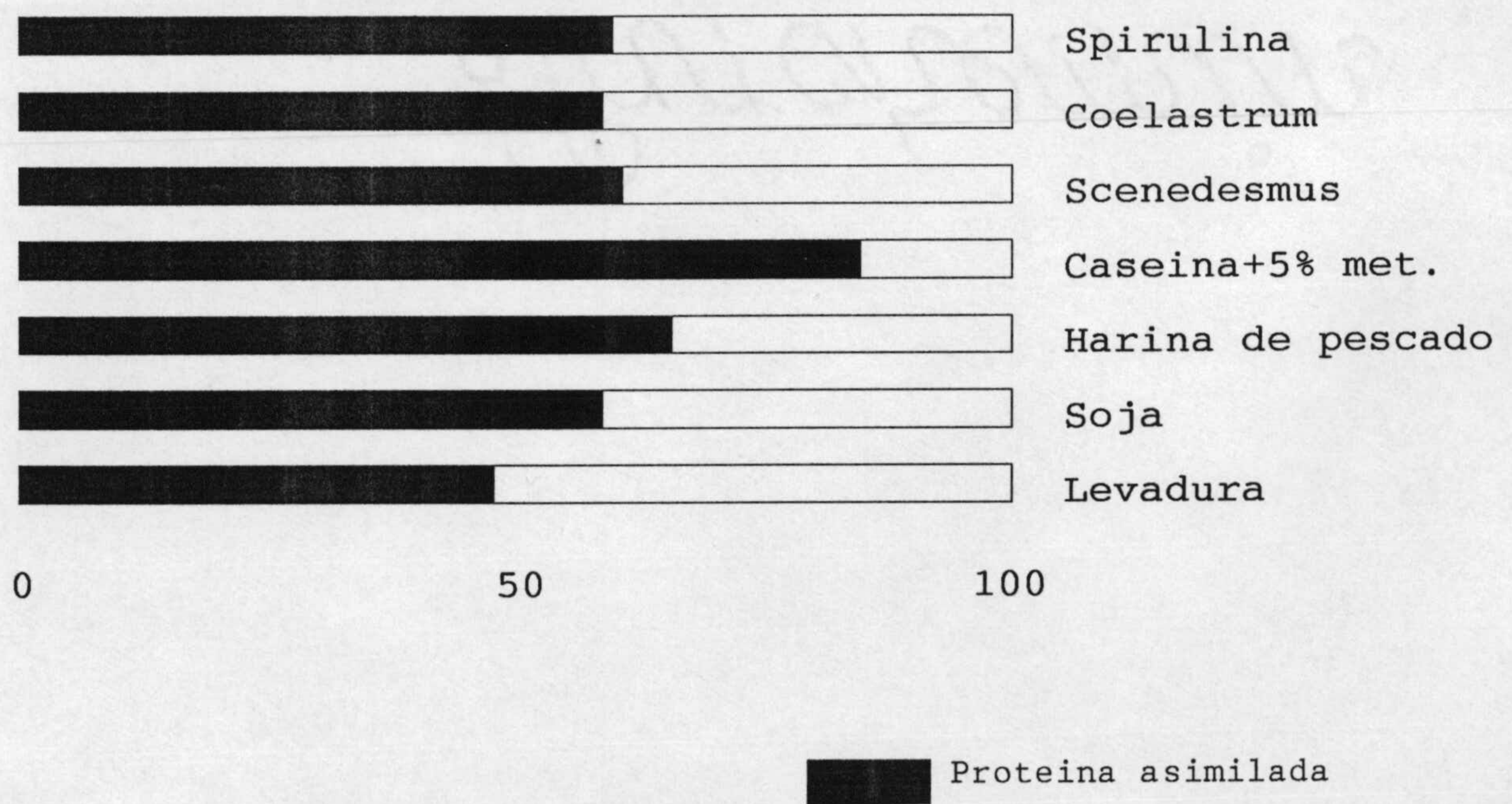


FIGURA 2.2

### 2.1.1.3 Aspectos toxicológicos

Para decidir si una biomasa es apta para la alimentación humana o animal hay que considerar además de su valor nutritivo, otros factores que aseguren la ausencia de efectos tóxicos en su consumo.

Entre éstos se consideran de mayor importancia los siguientes:

- Contenido en ácidos nucleicos de la biomasa.
- Contaminantes del cultivo.

#### *Acidos nucleicos*

Una de las limitaciones principales en el uso de microorganismos como fuente de alimentación puede ser el alto contenido en ácidos nucleicos (RNA y DNA). Estos constituyen aproximadamente del 4 al 6% del peso seco en la algas, del 8-12% para las levaduras y por encima del 20% para las bacterias.

Las purinas de los ácidos nucleicos se metabolizan y excretan como ácido úrico incrementando por consiguiente el riesgo de padecer gota, y enfermedades renales. Asumiendo un contenido de ácidos nucleicos en el alga del 6 %, se ha encontrado que para su adición a la dieta normal, el límite máximo tolerable es de 20 g/día. Becker (1984).

#### *Contaminación.*

En cultivos externos de microalgas algunas contaminaciones son inevitables debido a la condición no aséptica de los mismos.

Los contaminantes pueden ser de origen biológico o no biológico. De acuerdo con esta clasificación y para cultivos limpios, dentro del primer grupo se incluyen especies distintas del alga cultivada , bacterias, virus, zooplancton,



hongos e insectos, Mahadevaswamy y col. (1981).

Los contaminantes y la extensión de la contaminación puede variar con la localización geográfica, condiciones climáticas y sistema de cultivo en particular.

Dentro de los contaminantes no biológicos y en especial en los cultivos en aguas residuales se encuentran los metales pesados y pesticidas, Philips y cols (1992)

Las algas como otros microorganismos, son capaces de acumular metales pesados en concentraciones varios órdenes de magnitud más altos que la existente en el medio circundante. Este hecho justifica su utilización en la depuración de aguas residuales pero la biomasa no es útil en alimentación si sobrepasa las concentraciones en ppm siguientes : 5.0 Pb; 1.0 Cd; 0.1 Hg y 2.0 As, Forstner y col. (1979), Kajan y cols. (1992).

La existencia en los medios de cultivo de bifenilos policlorurados o hidrocarburos aromáticos policíclicos impide también la utilización de la biomasa en alimentación.

#### 2.1.2 EXTRACCION DE PRODUCTOS COMERCIALES

La subida de precios de los aceites fósiles y su escasez futura ha producido un gran incremento en los precios de los derivados químicos y ha originado un gran interés por el cultivo de microalgas para la extracción de productos comerciales.

La ventajas principales de las microalgas como fuente de sustancias químicas son:

- Alta eficiencia de conversión de la energía solar en materia orgánica, en comparación con las plantas superiores.
- La biomasa entera contiene el producto deseado o bien éste es excretado al medio de cultivo.

- Al tener un ciclo de vida pequeño, pocas horas, la mejora genética y la selección de las especies, para un fin concreto, es fácil.
- Algunas modificaciones en el cultivo pueden inducir la producción masiva del compuesto de interés.

Ademas de la obtención de lípidos y polisacáridos se puede destacar la producción de :

**-Glicerol** por la especie *Dunaliella*. Este se obtiene como un producto intracelular, lo que hace necesario destruir la membrana de la célula, pudiendose alcanzar producciones de 12 g/m<sup>2</sup>/dia, Ben-Amotz y cols (1980),(1982), (1990).

**-Sorbitol y manitol**, como productos intracelulares, a partir de las especies *Stichococcus* y *Platynomonas* respectivamente.

**-Pigmentos:** a partir de *Chlorella pyrenoidosa* y *Spirulina*. El contenido en clorofila de estas microalgas, puede ser del orden del 0.1 al 6% del peso seco, dependiendo de las condiciones de cultivo. Una preparación de clorofilas de *Spirulina* se ha patentado como desodorante. También son de gran interés ficobilinas y carotenoides. Como media pueden éstos últimos constituir un 0.1 % del peso seco, sin embargo en *Dunaliella salina* este valor puede llegar a ser hasta del 14%, Ben-Amotz y col. (1980), Markowi y cols. (1993).

**-Productos farmacéuticos:** Tales como ácido acrílico por *Phaeocistis*, fenoles y ácidos grasos de capacidad antibiótica, Ohta y cols. (1993).

**-Preparaciones enzimáticas** para la industria bioquímica y para tests de laboratorio etc.

### 2.1.3 DEPURACION DE AGUAS RESIDUALES

Los sistemas combinados para el cultivo masivo de microalgas acoplado

al tratamiento de aguas residuales (HROP) fueron concebidos originalmente por Oswald (1957).

En los estanques de tratamiento las algas establecen una relación simbiótica con las bacterias aerobias, utilizando el dióxido de carbono y los nutrientes originados a través de la degradación de la materia orgánica, produciendo oxígeno fotosintético. Este oxígeno es utilizado por las bacterias que a su vez mineralizan compuestos de nitrógeno y fósforo originando así su desaparición, Bailey y col. (1977).

En la Figura 2.3 se ha representado esquemáticamente un diagrama combinado del tratamiento de aguas residuales y producción de metano usando los sistemas algas-bacterias, Oswald y col. (1980).

Aguas altamente contaminadas permiten solo el desarrollo de especies como *Euglena* y *Chlamydomonas*. Al decrecer la carga orgánica aparecen *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Micractinium*.

Generalmente en estos sistemas no se requieren gastos adicionales en nutrientes ya que los efluentes residuales contienen todos o casi todos los macro y micronutrientes necesarios para el crecimiento de las algas. Sin embargo, las velocidades de crecimiento observadas son bajas, Abeliovich (1980), lo que parece indicar la presencia en el estanque de factores que inhiban o limiten el crecimiento, tales como: Azov y cols. (1982)

- Limitación por luz
- Limitación por la fuente de carbono
- Inhibición por amoníaco a concentraciones superiores a 2mM
- Determinadas infecciones.

Abeliovich (1980) argumenta contra la tesis de limitación por la luz, ya que calcula teniendo en cuenta la respiración y la excrección de materia orgánica al medio que del 25 al 50% del carbono de las algas proviene directamente de la materia orgánica del agua y no de la fotosíntesis. Así pues la naturaleza mixotrófica y heterotrófica de la nutrición de las algas puede ser la explicación de los rendimientos en carbono tan elevados, del orden de 40 g/m<sup>2</sup>d que se han publicado sobre estos sistemas. En la Figura 2.4 se esquematiza el posible ciclo del C

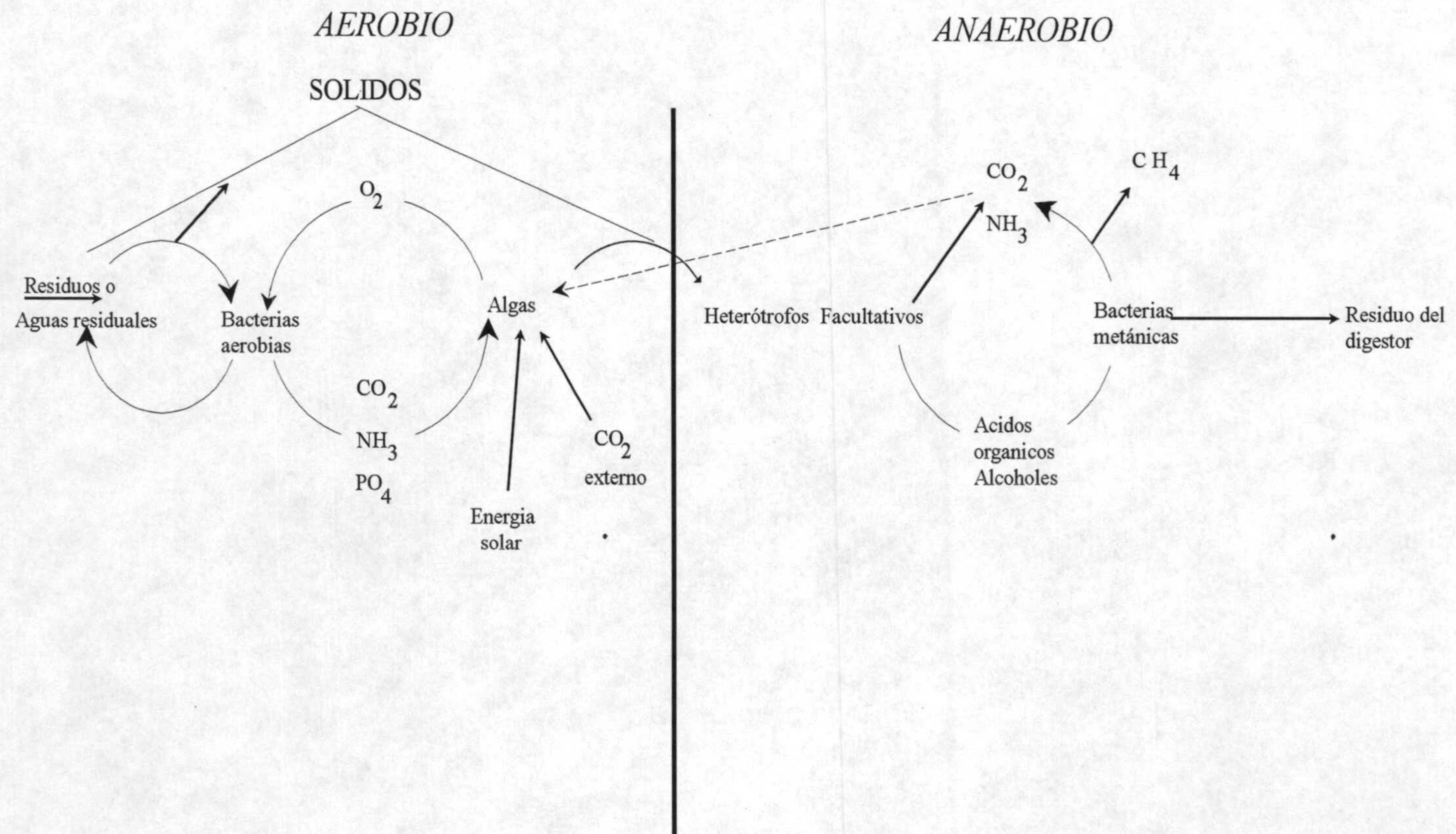
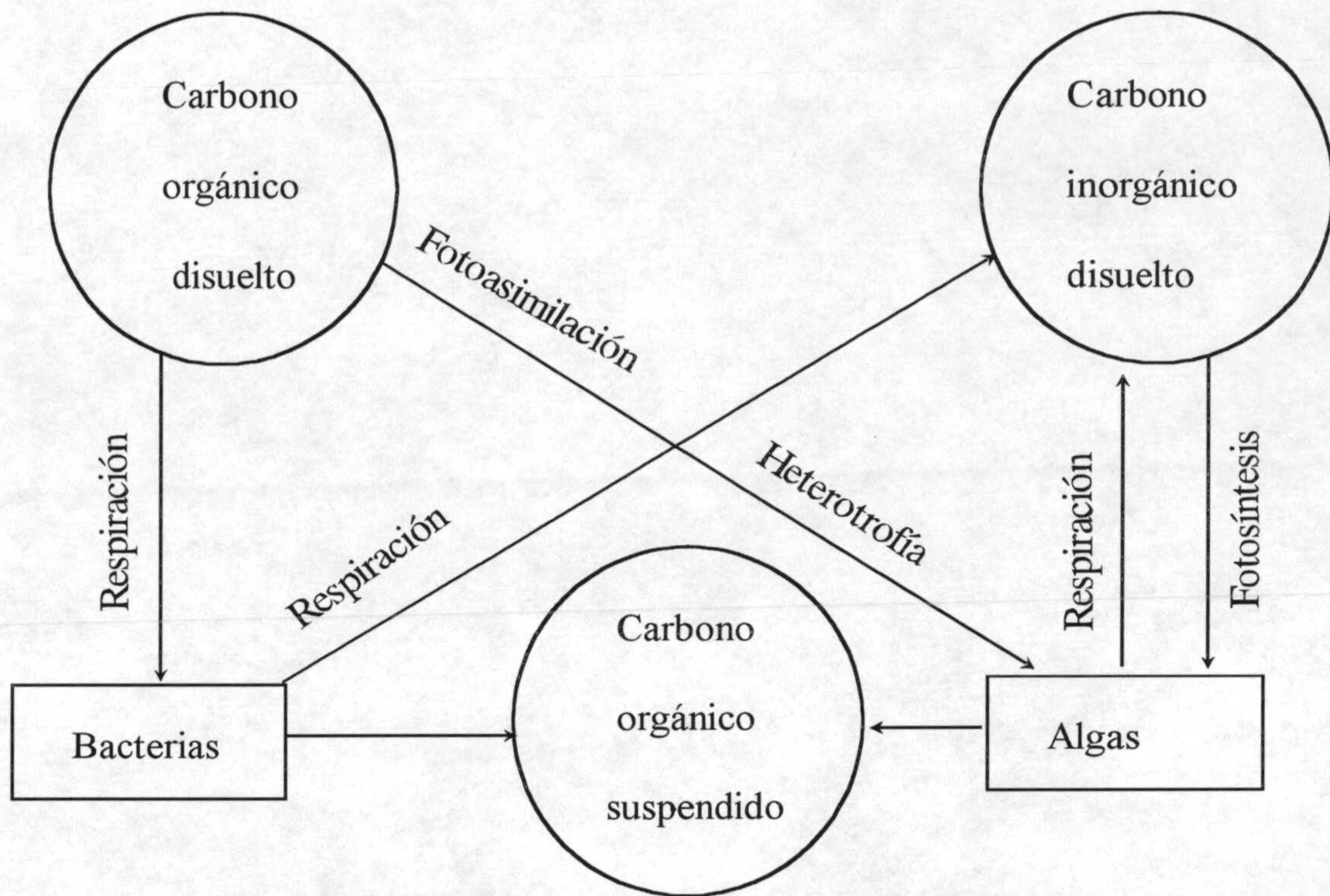


Figura 2.3



Ciclo del carbono en un H.R.O.P.

Figura 2.4

existente dentro de un estanque.

Este hecho pone en duda el papel de la población de bacterias en la reducción del DBO, creyéndose actualmente que solo ejercen un papel clave en la degradación de algunos polímeros tales como celulosas.

#### 2.1.4 LAS ALGAS COMO FUENTE DE ENERGIA

La alta eficacia de conversión de la energía solar por las algas puede usarse para la producción de biomasa y en una segunda etapa mediante una fermentación anaerobia a través de un proceso combinado algas-bacterias obtener metano Figura. 2.3

Se ha aplicado este procedimiento a cultivos mixtos de *Scenedesmus* y *Chlorella*, Golueke y cols. (1957), *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Euglena*, Golueke y col. (1959). Chen (1987) con *Spirulina* ha obtenido gas con una concentración aproximada en metano del 65%.

Keenan(1977) estudiando el aprovechamiento de la energía solar para bioproducción de metano con *Anabaena flosaquae* encuentra una eficacia media de conversión del 1% y estima que la energía necesaria para el crecimiento y cosechado de las algas es solo del 12% del metano producido. Por otra parte en investigación, se está utilizando una especie muy adecuada para la producción de hidrocarburos, como es *Botryococcus braunii*. Estos hidrocarburos surgen como productos excretados por la célula consiguiéndose por tanto el doble objetivo de aprovechamiento de biomasa y obtención de un producto extracelular.

Se ha determinado que son hidrocarburos insaturados ramificados ( $C_{34}H_{58}$ ) que pueden llegar a constituir el 76% del peso seco del alga, Pirt (1984)

Las algas unicelulares son capaces de crecer en diferentes medios ambientes y utilizan para su crecimiento distintas rutas metabólicas o sistemas enzimáticos.

Existe una clasificación general de los distintos tipos de crecimiento, basada en las condiciones de nutrición de las algas unicelulares. Esta división no es clara pues existen términos que son utilizados con distinto sentido por diferentes autores.

Neilson y col. (1974) han intentado resumir y estandarizar los siguientes tipos de crecimiento:

*Autotrofia o fotolitotrofia*, significa obtener energía por absorción de la luz mientras que el carbono celular se obtiene, exclusivamente, por reducción del dióxido de carbono.

*Mixotrofia*, implica obtener energía de la luz, mientras que el carbono celular se obtiene no sólo del dióxido de carbono sino también de un compuesto orgánico que suplementa al medio de cultivo.

*Fotoheterotrofia*, fotometabolismo o fotoasimilación, significa obtener energía de la luz, mientras que el carbono celular es obtenido exclusivamente de un sustrato orgánico. Stanier (1973) lo define como la capacidad de crecer con luz en presencia de DCMU (un inhibidor de la fotosíntesis).

*Heterotrofia*, capacidad de las algas de mantener crecimiento y división celular en la oscuridad. En este caso la energía y el carbono se obtienen del metabolismo de un sustrato orgánico.

*Anaerobiosis*, es la capacidad de crecimiento de las microalgas en ausencia de oxígeno, utilizando carbono orgánico como sustrato y en condiciones luminosas o en la oscuridad.

*Auxotrofia*, implica en muchas algas requerimiento de bajas concentraciones de compuestos orgánicos específicos que no contribuyen significativamente al carbono celular pero que es necesaria su presencia. A estos compuestos orgánicos, tales como determinadas vitaminas, se les denominan "factores de crecimiento".

### 2.2.1 CRECIMIENTO AUTOTROFICO

El crecimiento autotrófico, tiene lugar cuando se utiliza como fuente de energía la luz y como fuente de carbono el dióxido de carbono.

A bajas intensidades de iluminación existe una relación aproximadamente lineal entre la velocidad de fotosíntesis y la intensidad de iluminación.

Esta relación se cumple hasta un valor de la intensidad ( $I_s$ ) por encima de la cual la velocidad de fotosíntesis permanece constante. En un trabajo experimental realizado en este departamento, Camacho y col. (1983b), se encontró que para *Chlorella pyrenoidosa* la intensidad de saturación,  $I_s$ , es aproximadamente 1000 lux, ajustándose la variación de la velocidad específica de crecimiento con la intensidad inicial de iluminación, en el intervalo de 250 a 2500 lux, a una función de tipo exponencial.

Por otra parte, en una suspensión de algas unicelulares, de concentración 1 g/l, la intensidad de iluminación a una profundidad de 1 cm es aproximadamente 1/20 de la incidente, lo que pone de manifiesto que en capas más profundas el crecimiento estará limitado por la luz, Camacho y col. (1983a), Vonshak y col. (1992)

La mayor parte de las algas son organismos acuáticos, el  $\text{CO}_2$  debe disolverse en el medio acuoso previamente para poder ser asimilado, dependiendo del valor del pH el encontrarse como  $\text{CO}_2$  disuelto o en forma de aniones  $\text{CO}_3\text{H}^-$  y  $\text{CO}_3^{=}$ .



Una gran mayoría de investigadores consideran que *Chlorella* absorbe el  $\text{CO}_2$  en la forma sin disociar, ya que las membranas celulares son más permeables a ella, Osterlind (1948), Briggs y col. (1952), Kaplan (1986). Emerson y col. (1938) en cambio sugieren que debe haber algún mecanismo celular para la utilización del  $\text{CO}_3\text{H}^-$  ó  $\text{CO}_3^{\equiv}$  basándose en las elevadas velocidades de asimilación encontradas por Osterlind (1949) a pH relativamente altos, en que la concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto es despreciable Sokolov y col. (1992).

Emerson y col. (1938), encuentran que del 0.1 al 0.5 % en volumen de  $\text{CO}_2$  en la fase gaseosa es suficiente para una máxima velocidad de fotosíntesis y que aumenta esta concentración hasta el 5% en volumen no provoca ninguna mejora. Spoehr y col. (1949) por el contrario indican que hasta el 5% v/v el aumento de la concentración de  $\text{CO}_2$  en la fase gaseosa ejerce un efecto positivo sobre la velocidad de fotosíntesis.

Es interesante destacar, que no existe acuerdo entre los investigadores que han trabajado en este campo y que pueden clasificarse con facilidad en dos grupos:

Emerson y col. (1938); Davis y cols. (1953) y Nielsen (1955) indican que no existe un efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento al aumentar la concentración de  $\text{CO}_2$  en la fase gaseosa, y que la concentración óptima de  $\text{CO}_2$  es muy pequeña próxima a la natural, menor del 0.5%; por el contrario Spoehr y col. (1949); Osterlind (1950) y Warburg (1952), encuentran una mejora apreciable y sitúan la concentración óptima de  $\text{CO}_2$  alrededor del 5% v/v.

### 2.2.2 CRECIMIENTO HETEROTROFICO

El crecimiento heterotrófico, en algas unicelulares, tiene lugar en oscuridad cuando se utiliza un sustrato orgánico como fuente de carbono y energía. Este tipo de crecimiento es el que tiene lugar, fundamentalmente en un estanque de tratamiento de aguas residuales, ya que durante el periodo nocturno e, incluso, en pleno día a unos cm de la superficie existirá oscuridad total.

El crecimiento heterotrófico está supeditado a: sustrato orgánico utilizado; medio mineral empleado; condiciones experimentales como temperatura, pH, concentración de sustrato, aireación etc....

En la Tabla 2.5 se recogen diversos datos de la Bibliografía acerca del crecimiento heterotrófico.

Danforth (1962) afirma que el metabolismo en oscuridad de organismos fotosintéticos incluyendo éstos a las algas, es similar al de organismos no fotosintéticos. Por tanto, podría pensarse, desde un punto de vista bioquímico, que cualquier producto intermedio de la vía del metabolismo energético podría ser un sustituto de la fotosíntesis.

Entre los sustratos orgánicos más empleados se encuentran los azúcares, sobre todo los monosacáridos, y fundamentalmente glucosa. En la Tabla 2.6 se indican las especies de algas que tienen crecimiento heterotrófico con glucosa. Los restantes monosacáridos capaces de originar crecimiento heterotrófico en diversas algas unicelulares se muestran en la Tabla 2.7 .

En la Tabla 2.8 se indican otros azúcares y compuestos relacionados que pueden originar un crecimiento heterotrófico positivo. Los ácidos ó sus sales y alcoholes que son capaces de sostener un crecimiento positivo se recogen en la Tabla 2.9.

Endo y col. (1972) encuentran crecimiento del alga *Chlorella regularis* S-50 en acetaldehido y *Chlorella ellipsoidea* crece aunque a baja velocidad en glicolato sódico, según Samejima y col. (1958).

En el mismo trabajo anterior de Endo y col. (1972) *Chlorella regularis* S-50 ve favorecido su crecimiento heterotrófico con la adición de determinados aminoácidos como alanina, ácido aspártico, glicina, ácido glutámico, y la vitamina tiamina.

**Tabla 2.5**

AUTOR	ALGA	SUSTRATOS	TIPO DE CRECIMIENTO	CONDICIONES EXPERIMENT.	$\mu \text{ h}^{-1}$
Karlander y col. (1966)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa 10 g/L	Heterotrófico CO <sub>2</sub> 1%	pH = 6.5 T = 25 °C	—
Ogawa y col. (1981)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa 1-100 g/L	Heterotrófico	pH = 6.7 T = 30 °C	0.110
Ogawa y col. (1981)	<i>Scenedesmus acutus</i>	Glucosa 1-10 g/L	Mixotrófico CO <sub>2</sub> 2%	pH = 6.7 T = 30 °C	0.042
Samejima y col. (1950)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa 10 g/L	Heterotrófico CO <sub>2</sub> 5%	pH=5.6-5.8 T=25°C	0.044
Endo y col, (1972)	<i>Chlorella regularis</i> S-50	Glucosa 0- 50 g/L	Heterotrófico	pH=6.5 T=30°C	0.240

**Tabla 2.5 (Continuación)**

AUTOR	ALGA	SUSTRATO	TIPO DE CRECIMIENTO	CONDICIONES EXPERIMENT.
Makooi (1975)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa al 1%	Mixotrófico CO <sub>2</sub> 5%	pH=7
Follman y cols. (1978)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa	Mixotrófico	pH= 7 T=30°C
Lalucats y cols(1983)	<i>Chlorella sp VJ79</i>	Glucosa 1 g/L	Mixotrófico	pH=6.5 T=36°C
Endo y cols.(1977)	<i>Chlorella regularis</i>	Acetato	Mixotrófico 5% CO <sub>2</sub>	pH= 6.1-7.8 T=25°C
Shamala y cols. (1982a)	<i>Scenedesmus acutus</i>	Melazas y Glucosa	Mixotrófico 3% CO <sub>2</sub>	pH=6.5 T=36°C
Endo y col. (1972)	<i>Chlorella regularis</i> S-50	Glucosa, galactosa ácido acético, etanol, acetaldehído y ácido pirúvico	Mixotrófico 5% CO <sub>2</sub>	

TABLA 2.6

CRECIMIENTO HETEROTROFICO EN GLUCOSA

<u>Alga unicelular</u>	<u>Referencia</u>
<i>Prothotheca zopfii</i>	Barker (1935)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Neish (1951)
<i>Euglena gracilis</i> (var. <i>bacillaris</i> )	Cramer y col. (1952)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Samejima y col. (1958)
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	“ “ “
<i>Scenedesmus sp.</i>	“ “ “
<i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck	Karlander y col. (1966)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Rodríguez (1966)
<i>Chlorella vulgaris</i> (Emerson)	Griffiths (1970)
<i>Chlorella regularis</i> S-50	Endo y col. (1972)
<i>Anabaena sp</i>	Sahu y col. (1980)
<i>Chlorella vulgaris</i> 211/8k	Ogawa y col. (1981)
<i>Scenedesmus acutus</i>	“ “ “

Tabla 2.7

<u>ALGA</u>	CRECIMIENTO	HETEROTROFICO	EN OTROS	MONOSACARIDOS	<u>Referencia</u>
	<u>FRUCTOSA</u>	<u>MANOSA</u>	<u>GALACTOSA</u>	<u>XILOSA</u>	
<i>Prototheca zopfii</i>	+	+	+		Barker (1935)
<i>Chlorella vulgaris</i>	+		+		Neish (1951)
<i>Scenedesmus sp</i>	+	+	+		Samejima y col. (1958)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			+		“
<i>Chlorella ellipsoidea</i>			+		“
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	+	+	leve	+	Rodriguez (1966)
<i>Chlorella regularis S-50</i>			+		Endo y col. (1972)
<i>Anabaena sp</i>		+	+		Sahu y col. (1980)

TABLA 2.8

CRECIMIENTO HETEROTROFICO EN OTROS HIDRATOS DE CARBONO

<u>Alga</u>	<u>Compuesto</u>	<u>Referencia</u>
<i>Prototheca zopfii</i> " "	Sorbitol Manitol	Barker (1935) "
<i>Chlorella vulgaris</i> " "	Celobiosa Lactosa	Neish (1951) "
<i>Anabaena sp</i>	Lactosa	Sahu y col. (1980)
<i>Scenedesmus sp</i> " " " "	Maltosa Sacarosa Lactosa	Samejima y col. (1958) " " " "

TABLA 2.9

CRECIMIENTO HETEROTROFICO EN ACIDOS,SUS SALES Y ALCOHOLES

<u>Alga</u>	<u>Compuesto</u>	<u>Referencia</u>
<i>Prototheca zopfii</i>	Todos los ácidos desde C <sub>2</sub> a C <sub>10</sub>	Barker (1935)
<i>Anabaena sp</i>	Acetato sódico	Sahu y col. (1980)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> " <i>ellipsoidea</i> " <i>regularis S-50</i>	Acido acético " "	Samejima y col. (1958) " Endo y col. (1972)
<i>Euglena gracilis</i> <i>Prototheca zopfii</i> " "	" Acido láctico Acido pirúvico " "	Cramer y col. (1952) Barker (1935) Anderson (1945) Endo y col. (1972)
<i>Chlorella regularis S-50</i> " "	Etanol	Endo y cols (1974)

### 2.2.3 CRECIMIENTO MIXOTROFICO

En este tipo de crecimiento el alga crece en unas condiciones en las que dispone de CO<sub>2</sub> y carbono orgánico al mismo tiempo, y en presencia de luz.

Desde un punto de vista fisiológico Rodríguez (1964), observa que células de *Chlorella pyrenoidosa* crecidas en un medio mineral con glucosa, son células gigantes, esto está de acuerdo con Soeder (1980) que indica que cuando la división y la esporulación se retrasan o inhiben se originan células más grandes con enormes cantidades de sustancias de reserva, Griffiths (1970) ha mostrado que *Chlorella* cultivada en un medio con glucosa tiene su división inhibida, el peso es considerablemente mayor, y mayor el número de autoesporas que cuando crece en medio mineral. Esto origina que al inocular células de este tipo en un medio mineral normal en condiciones de autotrofismo se rompa la pared celular y el crecimiento sea considerablemente superior. Posteriormente Rodríguez (1966) estudiando el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* en medios con distintos azúcares encuentra que sólo los azúcares que son asimilados producen formas gigantes.

Makooi y cols. (1976) indican que el contenido de celulosa del alga *Chlorella pyrenoidosa* strain 395 es más alto en mixotrófico y mas bajo en autotrófico. El incremento del contenido en celulosa puede ser explicado si se asumen dos caminos para la síntesis de la misma. Uno la vía fotosintética, en la cual el CO<sub>2</sub> generado en el metabolismo de la glucosa es reasimilado en presencia de luz para síntesis de monosacáridos, que pueden polimerizarse a celulosa. Una segunda vía supone la utilización directa de glucosa exógena para obtener celulosa. En mixotrófico se puede dar la síntesis por las dos vías.

El alto consumo de azúcares en los cultivos expuestos a la luz y no aireados comparados con los mantenidos a la sombra, demuestra que la luz determina una diferencia en el consumo.

Griffiths (1970) refiriéndose a la relación luz-división celular sospecha la participación de alguna fotorreacción distinta de la fotosíntesis en el control de la división celular.



La inhibición de la división celular en todos los cultivos expuestos a la luz, aireados o no en presencia de hidratos de carbono asimilables la explica, Griffiths (1970), por el desequilibrio en el consumo de éstos en relación al nitrógeno, conforme mas baja sea la relación N/C más grande es el decaimiento en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, y como resultado la división celular se afecta negativamente.

Las formas gigantes son descoloridas debido a que el almidón desorganiza el cloroplasto y distribuye el pigmento en un volumen mayor.

Shamala y cols (1982b) encuentran que las células que crecen mixotróficamente tienen más cantidad de hidratos de carbono que las autotróficas.

En la Tabla 2.10 se recogen diversos datos de la Bibliografía acerca del crecimiento mixotrófico.

Samejima y col. (1958) estudian el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella ellipsoidea* y *Scenedesmus sp.* tanto en la luz como en la oscuridad utilizando fuentes de carbono orgánicas distintas.

El medio basal utilizado fue Knop, de los azúcares ensayados solo se obtuvieron buenos crecimientos de *Chlorella* en glucosa y galactosa, y de *Scenedesmus* solo en glucosa. Estos autores indican que la velocidad de crecimiento en azúcar+luz no es superior al efecto aditivo azúcar y luz presentados independientemente, Tabla 2.11.

Encuentran asimismo que no hay evidencia de un marcado incremento de la asimilación del azúcar por la luz. Los ácidos orgánicos son bastante tóxicos en su forma sin disociar, a pH 6,7 la adición de 1% (w/v) de acetato sódico inhibe el crecimiento, aumentando la toxicidad a pH menores.

Tabla 2.10

AUTOR	ALGA	SUSTRATOS	TIPO DE CRECIMIENTO	CONDICIONES EXPERIMENTALES	$\mu \text{ h}^{-1}$
Karlander y col. (1966)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa 10 g/L	Mixotrófico CO <sub>2</sub> 1%	pH = 6.5 T = 25 °C	—
Ogawa y col. (1981)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa 1-100 g/L	Mixotrófico CO <sub>2</sub> 2%	pH = 6 T = 30 °C “ + Dcmu	0.198 0.113
Ogawa y col. (1981)	<i>Scenedesmus acutus</i>	Glucosa 1-10 g/L	Mixotrófico CO <sub>2</sub> 2%	pH = 6 T = 30 °C “ + Dcmu	0.048 0.031
Samejima y col. (1950)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa 10 g/L	Mixotrófico CO <sub>2</sub> 5%	pH=5.6-5.8 T=30°C Luz débil Luz media	0.052 0.061
Samejima y col. (1950)	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Glucosa 10 g/L	Mixotrófico CO <sub>2</sub> 5%	pH=5.6-5.8 T=30°C Luz débil Luz media	0.052 0.061
Rodriguez (1966)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa,Fructosa Manosa ,Galactosa 16mM	Mixotrófico CO <sub>2</sub> 5%	T = 24 °C	—

Tabla 2.10 Continuación

AUTOR	ALGA	SUSTRATOS	TIPO DE CRECIMIENTO	CONDICIONES EXPERIMENTALES
Makooi (1976)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa al 1%	Mixotrófico CO <sub>2</sub> 5%	pH=7
Follman y col. (1978)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa	Mixotrófico	
Lalucats y cols. (1984)	<i>Chlorella sp VJ79</i>	Glucosa 1 g/L	Mixotrófico	pH= 7 T=30°C
Endo y cols. (1977)	<i>Chlorella regularis</i>	Acetato	Mixotrófico 5% CO <sub>2</sub>	pH=6.5 T=36°C
Shamala y cols. (1982b)	<i>Scenedesmus acutus</i>	Melazas y Glucosa	Mixotrófico 3% CO <sub>2</sub>	pH= 6.1-7.8 T=25°C
Endo y col. (1972)	<i>Chlorella regularis S-50</i>	Glucosa, galactosa ácido acético, etanol, acetaldehído y ácido pirúvico	Mixotrófico 5% CO <sub>2</sub>	pH=6.5 T=36°C

**TABLA 2.11**  
**Velocidad de Crecimiento h<sup>-1</sup>**

	Con azúcar	oscuridad	Luz débil	Luz media
Chlorella pyrenoidosa		0.044	0.052	0.061
" ellipsoidea		0.045	0.052	0.061
	<b>Sin azúcar</b>			
Chlorella pyrenoidosa		0	0,0009	0,016
" ellipsoidea		0	0,0019	0,018

Rodríguez (1966) estudiando el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* en un medio mineral "A" con adición de 16 mM de glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xylosa, arabinosa, ramnosa, sorbosa, lactosa, sacarosa y maltosa, encuentra que solo son asimilables glucosa, fructosa y manosa. Los resultados de asimilación, difieren de los de Samejima y col. (1958) lo que según el autor parece confirmar su sospecha de la existencia de modificaciones bioquímicas dentro de las mismas especies. La sacarosa no se asimila de acuerdo también con Milner (1953).

Endo y col. (1972) prueban el crecimiento de *Chlorella regularis* en diversos sustratos y encuentran que solo son utilizados glucosa, galactosa, ácido acético, etanol, acetaldehído y ácido pirúvico. El crecimiento mixotrófico consideran que puede ser la suma del autotrófico y heterotrófico. La eficiencia en la utilización de la luz fue mayor en cultivos mixotróficos que en el autotrófico. El hecho de que la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento sean mayores en cultivos mixotróficos lo interpretan basándose en que en un cultivo mixotrófico, la asimilación oxidativa de las fuentes de carbono orgánicas y la asimilación del CO<sub>2</sub> a través de las reacciones fotosintéticas ocurren simultáneamente y se suman originando así una estimulación del crecimiento celular.

Follmann y cols. (1978), en cultivos de *Chlorella vulgaris*, llegan a las

mismas conclusiones que Samejima y col. (1958), en cuanto a que el crecimiento puede intensificarse por adición de glucosa a intensidades de iluminación bajas o en cultivos densamente poblados, pudiendo la glucosa reemplazar a la luz como fuente de energía. Los valores de la constante de saturación,  $K_s$ , para glucosa en estas condiciones son pequeños del orden de 10 mg/l, no existiendo por encima de este valor ningún aumento de la velocidad de absorción. A altas intensidades de luz la velocidad de crecimiento autotrófico es casi tan alta como la mixotrófica y por lo tanto en estas condiciones se está desperdiciando glucosa.

Karlander y col. (1966) encuentran que *Chlorella vulgaris emerson*, no puede crecer heterotróficamente en glucosa en la oscuridad y si lo hace en presencia de la luz. Los requerimientos de  $O_2$  relativamente altos para el crecimiento en la oscuridad sugieren que la estimulación del crecimiento por la luz podría estar localizado en el mecanismo respiratorio a través de su acción sobre la síntesis de un citocromo de la cadena oxidasa terminal.

Endo y cols. (1977b) encuentran que cuando las células se cultivan bajo condiciones mixotróficas (luz + Acetato 10 mM en medio mineral) la velocidad de crecimiento es aproximadamente la suma de las velocidades autotróficas + heterotróficas. La adición del inhibidor de la fotosíntesis CMU [ 3 -(p - clorofenil) - 1, 1 -dimetilurea] a una concentración 50  $\mu$ M, causa una completa supresión del crecimiento autotrófico pero no altera el crecimiento heterotrófico. Cuando se adiciona el inhibidor el crecimiento mixotrófico decrece al nivel del heterotrófico.

	$\Delta V_p$ / día
Luz + medio mineral	3.4
Luz + " + CMU	0
Oscuridad + " + acetato	6.6
Oscuridad + " + acetato + CMU	6.6
Luz + " + acetato	10.2
Luz + " + acetato + CMU	6.4

La intensidad de luz fue 10 Klux y  $\Delta V_p$  /día representa la velocidad lineal de crecimiento que se calcula según

$$\Delta V_p/\text{día} = V_p \cdot \mu \cdot 24 \quad (\mu = \text{velocidad específica de crecimiento.})$$

$$(V_p = \text{concentración celular ml/l})$$

Estos hechos indican según Endo y cols. (1977) que los procesos del crecimiento mixotrófico son la suma del autotrófico + heterotrófico que transcurren sin competencia entre ellos. La velocidad de crecimiento en el cultivo mixotrófico aumenta con la subida de la intensidad de iluminación hasta los 15 Klux en que decrece esta velocidad. Este hecho no es observado en el crecimiento autotrófico.

Ogawa y col. (1981) estudian y analizan el crecimiento mixotrófico de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* encontrando que la velocidad específica de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en presencia de glucosa fue siempre mayor que en autotrófico, cuando la intensidad de luz era inferior a 10 Klux, este comportamiento para *Scenedesmus* se dio hasta los 6 Klux, a partir de este valor hubo una inversión en la  $\mu$ . El contenido en clorofila a y b para *Scenedesmus* se deterioró más marcadamente que el de *Chlorella vulgaris* lo que puede justificar los distintos comportamientos. Parte de los resultados obtenidos por estos autores se resumen en la siguiente tabla:

<u>Condiciones de cultivo</u>	<u>DCMU</u>	<u>Velocidad específica, h<sup>-1</sup></u>	
		<u>C. vulgaris</u>	<u>S. acutus</u>
Autotrófico	-	0.110	0.061
“	+	0.000	0.000
Heterotrófico	-	0.098	0.040
“	+	0.110	0.042
Mixotrófico	-	0.198	0.048
“	+	0.113	0.031

Ogawa y col. (1981), encuentran que para *Chlorella* la velocidad específica de crecimiento mixotrófico es la suma de los del autotrófico y heterotrófico.

$$\mu_M = \mu_A + \mu_H$$

y para *Scenedesmus* para una intensidad de iluminación superior a 6 Klux:

$$\mu_M < \mu_A$$

$$\mu_M > \mu_H$$

El problema de si un alga verde se va a comportar de un modo u otro depende de en que extensión la mitocondria de un alga, que es responsable del metabolismo de la glucosa en colaboración con los pigmentos del cloroplasto, permanece intacta o no bajo la irradiación luminosa.

En la tabla anterior se muestra, también, el efecto de la presencia (+) o ausencia (-) del DCMU, 3, -(3,4 -diclorofenil)-1,1-dimetilurea, sobre la velocidad específica de crecimiento. En *Chlorella* la adición de DCMU al crecimiento mixotrófico hace que éste se reduzca al heterotrófico, en condiciones autotróficas este compuesto inhibe totalmente el crecimiento, mientras que en condiciones heterotróficas no se detectan cambios por la presencia del DCMU. Lo anterior indica que la actividad oxidativa del alga *Chlorella* no se afecta solo por la presencia de la luz.

La actividad fotosintética de *Scenedesmus* es susceptible a la glucosa y la actividad oxidativa se afecta ligeramente por la luz.

Shamala y cols. (1982a) trabajan con el alga *Scenedesmus acutus*, en presencia de glucosa marcada con  $^{14}\text{C}$ , en un ciclo luz/oscuridad de 10/14 horas y una concentración del 3% de  $\text{CO}_2$ . Obtienen como resultado que la glucosa se convierte a ácido glutámico, aspártico y alanina tanto en la luz como en la oscuridad. Estas observaciones sostienen que están implicadas las reacciones de glicolisis de la vía EMP o de la pentosafosfato y el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Los mismos autores Shamala y cols. (1982b) en otro trabajo llegan a algunas conclusiones que se pueden resumir así. La velocidad de crecimiento aumenta con la concentración de melaza (sustrato orgánico). La adición de azúcares mejora la fotosíntesis. Encuentran asimismo que la adición de glucosa al cultivo estimula al máximo el desprendimiento de  $\text{O}_2$ , en menor proporción también lo hacen manosa, sacarosa y fructosa.

Lalucats y cols., (1984) afirman que aunque el mixotrofismo usualmente representa el uso simultáneo de luz y glucosa como fuente de energía y la

asimilación simultánea de CO<sub>2</sub> y glucosa como fuente de carbono, en su caso también representa un incremento en la cantidad de energía luminosa usada con respecto al autotrofismo y una disminución de la fracción de esta energía empleada en la fijación del CO<sub>2</sub>. Así, el metabolismo mixotrófico de *Chlorella sp VJ79* resulta con una alta eficacia energética y donde la cantidad de energía disipada es mínima. Estos autores ensayan asimismo como fuente de carbono orgánico: serina, glicina, alanina, sacarosa, citratos, acetatos, glutamato y etanol. De todos estos compuestos *Chlorella sp VJ79* solo puede oxidar glicina, acetato y alanina y encuentran que el crecimiento mixotrófico fue la suma de autotrófico y heterotrófico para acetato pero fue superior para alanina y glicina.

Para la glucosa las velocidades y rendimientos del crecimiento son superiores a la suma de autotrófico y heterotrófico. La glucosa además origina un profundo cambio en el sistema pigmentario, en forma cualitativamente similar al cambio que ocurre durante el crecimiento heterotrófico. Además hay una disminución simultánea en la fijación autotrófica del CO<sub>2</sub> es decir, una inhibición del ciclo de Calvin.

#### 2.2.4 CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

El crecimiento fotoheterotrófico tiene lugar cuando se usa como fuente de energía la luz y como principal fuente de carbono un sustrato orgánico.

Existen pocos estudios acerca de este tipo de crecimiento y a menudo se confunde en la Bibliografía con el crecimiento mixotrófico.

Rodríguez (1966) estudia este crecimiento en las mismas condiciones que el mixotrófico y heterotrófico sólo que no airea los cultivos con la mezcla de aire y CO<sub>2</sub> al 5%, desde un punto de vista fisiológico encuentra igual que en el crecimiento mixotrófico un cambio en tamaño de las células, hay gigantismo, y aumenta el contenido en hidratos de carbono. Como sustratos utiliza glucosa, fructosa, manosa y xilosa, encontrando que el consumo de hidratos de carbono de los cultivos fotoheterotróficos es superior al doble de los cultivos mixotróficos para



glucosa, fructosa y manosa.

Karlander (1966) estudia principalmente el crecimiento mixotrófico y encuentra una velocidad de crecimiento máxima a  $I_s = 0.8 \mu\text{w}/\text{cm}^2$ , valor de intensidad luminosa que está por debajo del punto de compensación para la fotosíntesis. Este dato así como los experimentos realizados en condiciones fotoheterotróficas en las que se excluía el uso de  $\text{CO}_2$  indica que la fotosíntesis no es la razón de la estimulación del crecimiento heterotrófico en presencia de luz.

Endo y cols. (1972), hacen referencia en sus tablas a un crecimiento en sustrato orgánico + luz y encuentran unas velocidades específicas de crecimiento parecidas a las del heterotrófico e inferiores al del autotrófico y mixotrófico. Aunque en las tablas estos autores indican solo sustrato orgánico + luz se deduce del texto que realmente no suprimen totalmente el suministro de  $\text{CO}_2$  si no que suministran el aire atmosférico sin suplementar con  $\text{CO}_2$ , con lo que estamos en crecimiento mixotrófico a una concentración del  $\text{CO}_2$  muy inferior. Igual le ocurre a Shamala y cols. (1982 c) cuando indican que entre los cultivos mixotróficos, la mayor cantidad de sacarosa y polisacáridos se encuentra cuando el  $\text{CO}_2$  no se suministra a los cultivos en la fase luminosa, quiere decir que no se suplementa con  $\text{CO}_2$  el aire, pero tampoco lo eliminan.

#### 2.2.5 CRECIMIENTO ANAEROBIO

Aunque las algas producen oxígeno durante la fotosíntesis y usualmente no están asociadas a ambientes caracterizados por bajas presiones parciales del mismo, se ha encontrado que un gran número de especies son capaces de un metabolismo anaerobio altamente especializado, Neilson y col. (1974).

La glucosa puede metabolizarse bajo condiciones anaerobias, y aunque la fermentación de glucosa en presencia de luz se ha comprobado en varias algas Gibbs (1962), solo se conoce un caso de crecimiento heterotrófico anaerobio, Hoare y cols. (1971).

Existe poca información sobre el crecimiento anaerobio en glucosa de *Chlorella* y las investigaciones al respecto se han dirigido fundamentalmente al estudio de los productos de fermentación. Las primeras investigaciones sobre fermentación por algas fueron realizadas por Genevois (1927) quien encontró que *Chlorella pyrenoidosa*, *Coelastrum proboscideum* y *Scenedesmus basiliense*, producen CO<sub>2</sub> y ácido orgánico sin especificar, en condiciones anaerobias y con varias hexosas.

Michels (1940) mostró que *Chlorella pyrenoidosa*, fermenta la glucosa a ácido láctico y otros ácidos orgánicos sin especificar, mientras que *Scenedesmus* produce principalmente CO<sub>2</sub> y una escasa cantidad de ácidos orgánicos. Nakayama y cols. (1974) ensayan 217 cepas de algas y solo dos cepas de *Chlorella sp.* fueron capaces de crecer en una atmósfera de nitrógeno con absorbente del CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y en presencia de luz, necesitaron además la adición de vitaminas, peptona, extracto de levadura y glucosa o acetato. El CMU (clorofenil -1,1-dimetilurea), inhibidor de la fotosíntesis a 10<sup>-5</sup> M inhibe el crecimiento anaerobio de las dos cepas.

Cuando se eliminan los absorbentes de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> varias especies más crecen en un medio orgánico en atmósfera de nitrógeno y con presencia de luz.

*Chlorella pyrenoidosa* C-28 da un rendimiento en mg de biomasa de 71.8, 66.8 y 47.8 por 100 mg de glucosa sin luz y en cultivos cerrados, sin luz y cultivos abiertos, y en cultivos abiertos y luz respectivamente.

Syrett y col. (1963), obtuvieron la siguiente relación estequiométrica por mol de glucosa para *Chlorella vulgaris* 0.6 mol acetato, 0.6 moles de formiato, 0.7 moles lactato y CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> 0.3 moles de cada, productos cuantitativa y cualitativamente semejantes a los obtenidos en la llamada fermentación ácida-mixta de glucosa por *Escherichia coli*.

Kreusberg utiliza el alga *Chlorogonium elongatum* en un medio que contiene acetato en presencia de luz, en atmósfera inerte de N<sub>2</sub> y añadiendo DCMU 10<sup>-6</sup> M para excluir la producción de O<sub>2</sub> y el uso del fotosistema II para la fotoasimilación del carbono orgánico. El casi completo balance de carbono, como la baja producción de CO<sub>2</sub> indica, que el material orgánico fue exclusivamente utilizado en la producción de biomasa y no se aprovechó como fuente de energía,

obteniéndose una velocidad máxima de crecimiento de  $0.29 \text{ h}^{-1}$  a una concentración de 10 mM de acetato.

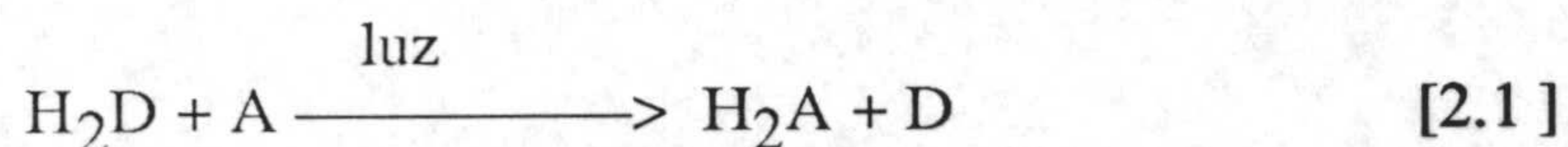
El factor que limita el crecimiento anaerobio de las algas es la disponibilidad energética, mientras 1 mol de glucosa oxidada por 6 moles de  $\text{O}_2$  produce aproximadamente 700 Kcal. , la fisión anaerobia de 1 mol de glucosa produce solo 60 Kcal.

## 2.3 PROCESOS BIOLÓGICOS

### 2.3.1 FOTOSÍNTESIS

Las algas son organismos que en presencia de luz realizan la función fotosintética. Esta función que solo las algas, plantas verdes y algunas bacterias realizan se entiende como la conversión de la luz en energía química fisiológica y su utilización en la síntesis de compuestos de mayor contenido energético (biomoléculas) a partir de otros más estables, agua, CO<sub>2</sub>, nitratos, sulfatos, fosfatos, etc...

La ecuación general del proceso se puede expresar:



Donde H<sub>2</sub>D representa un dador electrónico, (H<sub>2</sub>O, SH<sub>2</sub>, isopropanol ..) y A un aceptor electrónico (CO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>=</sup>, N<sub>2</sub>, H<sup>+</sup>) diferentes según el tipo de organismo fotosintético y la ruta metabólica considerada, Losada .(1977).

El proceso global representado por la ecuación [2.1 ] se realiza en dos fases:

- La primera de carácter fotoquímico consiste en la captación de la energía luminosa y su conversión en energía química de ATP y NADPH.
- La segunda de carácter enzimático implica la utilización de la energía química formada en la fase anterior.

Arnon .(1958) comprobó que ambas fases pueden separarse temporalmente y que los cloroplastos son capaces de efectuar el proceso fotosintético completo conducente a la formación de hexosas, es decir son unidades

fotosintéticas completas.

#### 2.3.1.1 Pigmentos:

La radiación electromagnética útil para la fotosíntesis es la comprendida entre las longitudes de onda de 400 a 720 nm.

En las algas, hay tres tipos principales de pigmentos capaces de captar esta radiación:

- Clorofilas
- Carotenoides
- Ficobilinas

Dentro del grupo de las clorofilas se han identificado formas diferentes (a,b,c,d). La clorofila a es el pigmento fotosintético primario para todas las algas y es el único tipo de clorofila para las algas verdes-azuladas y rojas. Las algas pardas y diatomeas contienen también clorofila c, Bogorad (1962).

Todas las clorofilas absorben eficazmente luz en la zona visible del espectro, debido a sus muchos dobles enlaces conjugados. Además, la energía luminosa de los fotones absorbidos por una molécula de clorofila puede deslocalizarse y difundirse a través de toda la estructura electrónica de la molécula excitada

Los carotenoides principales existentes en los cloroplastos son carotenos y xantofilas. Warburg y col.(1923) demuestran para *Chlorella* que la luz absorbida por los carotenoides es utilizada en la fotosíntesis.

Existe una gran similitud entre el contenido en xantofilas de las plantas superiores y las algas clorofíceas especialmente en el contenido en luteína. Mixoxantinas y mixoxantofilas solo se han detectado en las algas verde-azuladas.

Las ficobilinas se encuentran de forma significativa solo en cianofíceas y algas rojas.

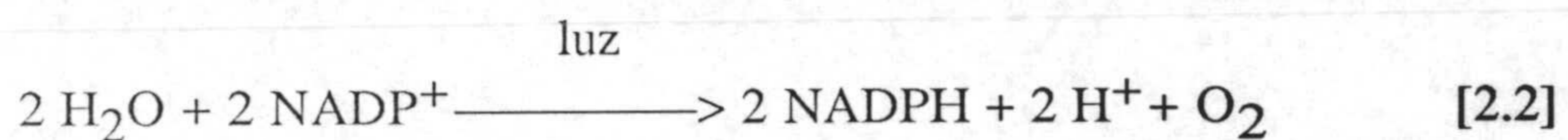
Los pigmentos fotosintéticos de los cloroplastos se hallan organizados en dos conjuntos o agrupaciones funcionales, conectados por cadenas de transporte

electrónico . Estas agrupaciones son los llamados fotosistemas I y II.

Asociado a estos fotosistemas se ha descubierto la existencia de dos pigmentos colectores de excitones (cuantos de energía de excitación de la otras moléculas de clorofila) formados por complejos de proteína-clorofila especializados. Uno es el llamado P700 que posee un máximo de absorción a 700 nm y se decolora cuando se ilumina la célula. El otro se llama P680 y tiene su máximo a 680 nm, Govindjee .(1974).

### 2.3.1.2 Utilización de la energía luminosa

La primera fase de la fotosíntesis transcurre según la reacción :



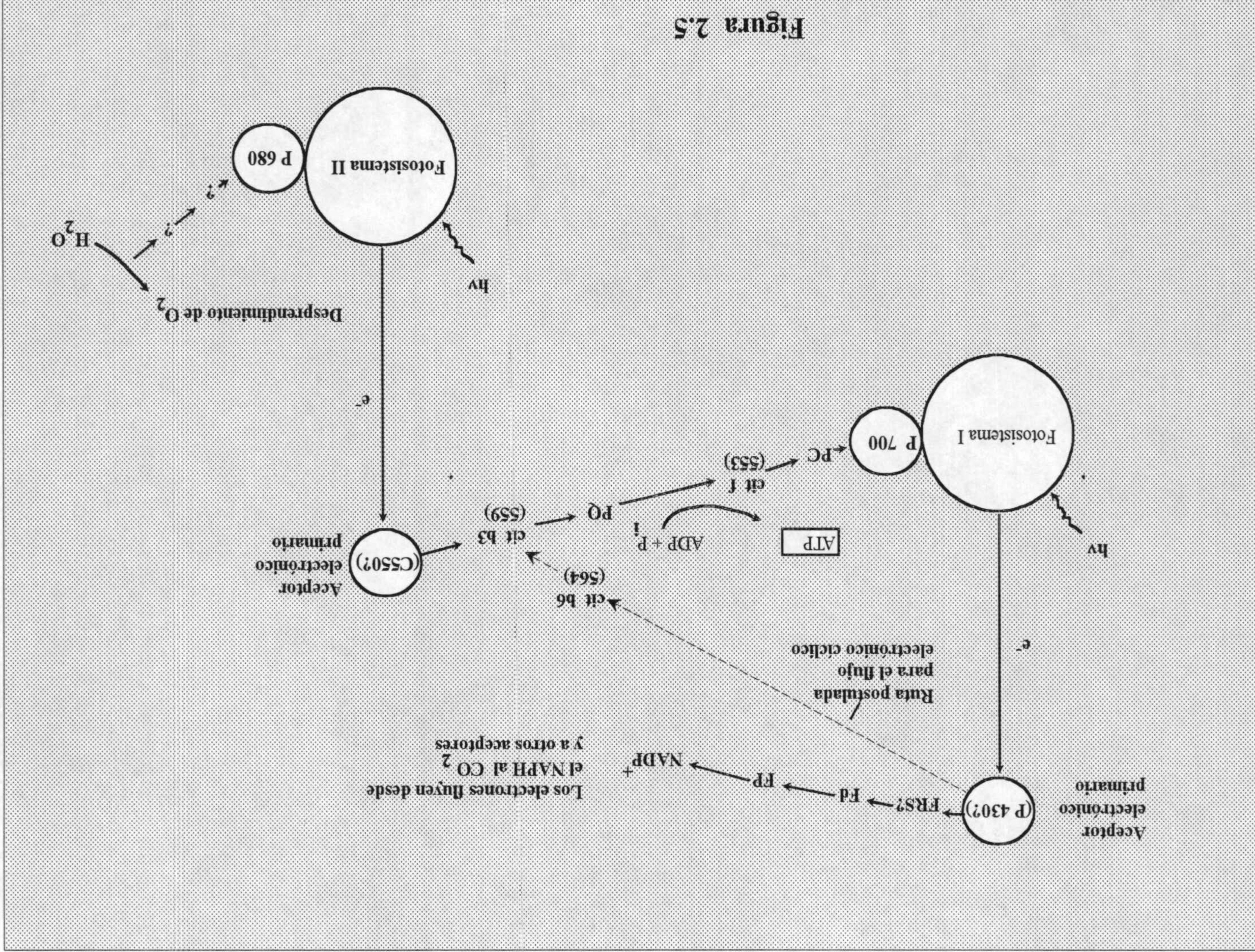
comprobada en cloroplastos de diversos tipos de algas por Aronoff (1946) y Hill y cols.(1953).

La reacción anterior se realiza en dos etapas y en dos sistemas pigmentarios distintos, los fotosistemas I y II. Ambos fotosistemas están conectados y liberan energía en una cadena de transporte electrónico que se extiende desde el agua dador electrónico al  $\text{NADP}^+$  aceptor electrónico.

La ruta completa del flujo electrónico se indica en la Figura 2.5 mediante un esquema en Z, Lenhinger (1979).

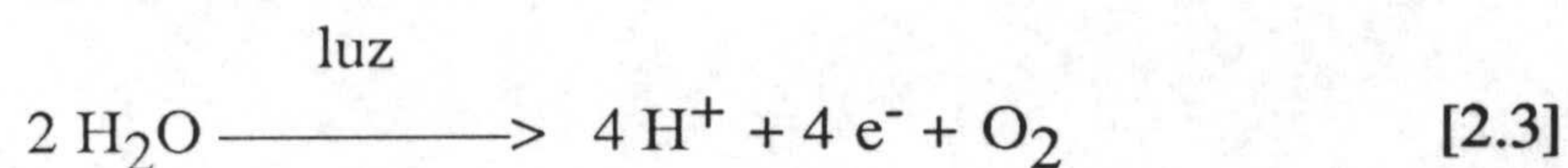
Cuando un cuanto de luz es absorbido por los pigmentos del FSI se produce un excitón que es captado por P700, éste pierde un  $e^-$  que es transferido a su aceptor electrónico primario, un pigmento denominado P430, este  $e^-$  fluye mediante una cadena de transporte hasta el  $\text{NADP}^+$  provocando su reducción a NADPH (precisándose  $2e^-$  por molécula de  $\text{NADP}^+$ ).

Figura 2.5



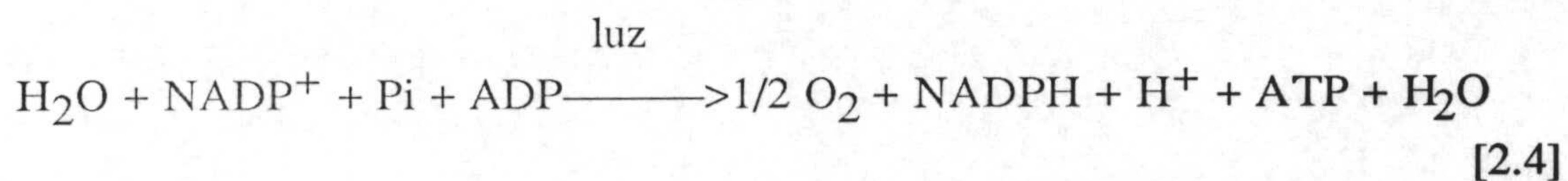
La pérdida de 1 e<sup>-</sup> de P700 lo transforma en su forma oxidada P700<sup>+</sup>, el e<sup>-</sup> necesario para volver a su estado inicial es aportado por la cadena central de transportadores electrónicos que se extiende entre FSI y FSII y se origina al captarse 1 fotón en el fotosistema II, el electrón que precisa P680 para volver a su estado inicial proviene de la molécula de H<sub>2</sub>O a través de una cadena de transportadores electrónicos.

Esta última etapa da origen al desprendimiento de oxígeno molecular, según la reacción:



Por cada electrón que fluye desde el agua al NADP<sup>+</sup> se tienen que absorber dos cuantos de luz. Para formar una molécula de O<sub>2</sub> que necesita la transferencia de 4e<sup>-</sup>, se deben absorber en total 8 cuantos de luz.

En la Figura 2.5 se muestra que la fosforilación de ADP a ATP se halla acoplada al flujo de e<sup>-</sup> y localizada en la cadena central que une los dos fotosistemas. No se sabe con certeza si se forman uno o dos moles de ATP por par de electrones desplazados de FSII al FSI. Si solo se forma 1 mol el proceso global comentado podría representarse por:

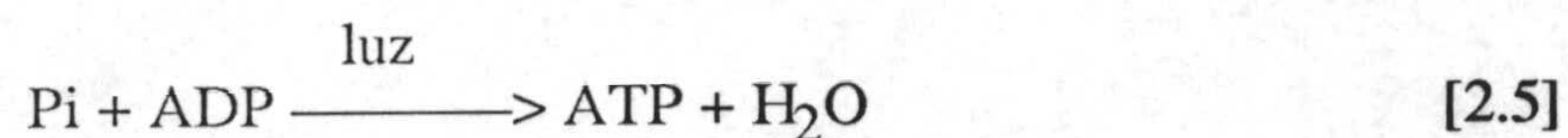


Otro tipo de flujo electrónico inducido por la luz es el flujo cíclico. En este flujo electrónico solo participa el FSI, no se desprende oxígeno y no se reduce el NADP<sup>+</sup> (Figura 2.5).

En el flujo cíclico el e<sup>-</sup> capturado por el primer aceptor P430 a partir de P700 en vez de reducir al NADP<sup>+</sup> vuelve al FSI por un camino alternativo. Este camino implica a algunos transportadores electrónicos de la cadena comprendida entre el fotosistema I y II incluyendo el segmento que contiene la fosforilación.



La reacción global para el flujo electrónico cíclico y la fotofosforilación asociada puede expresarse por:



y se cree ocurre cuando las células fotosintéticas están saturadas de NADPH pero requieren ATP adicional para sus necesidades metabólicas.

### 2.3.1.3 Asimilación de CO<sub>2</sub>-Fotosíntesis de hidratos de carbono

La mayoría de las investigaciones sobre la fotosíntesis en algas conducen a que el camino para la fijación autotrófica del CO<sub>2</sub> es el ciclo de Calvin.

Este ciclo en las algas eucariotas se realiza en los cloroplastos y se ha demostrado que todos los enzimas necesarios están presentes en *Chlorella pyrenoidosa*, Raven (1974).

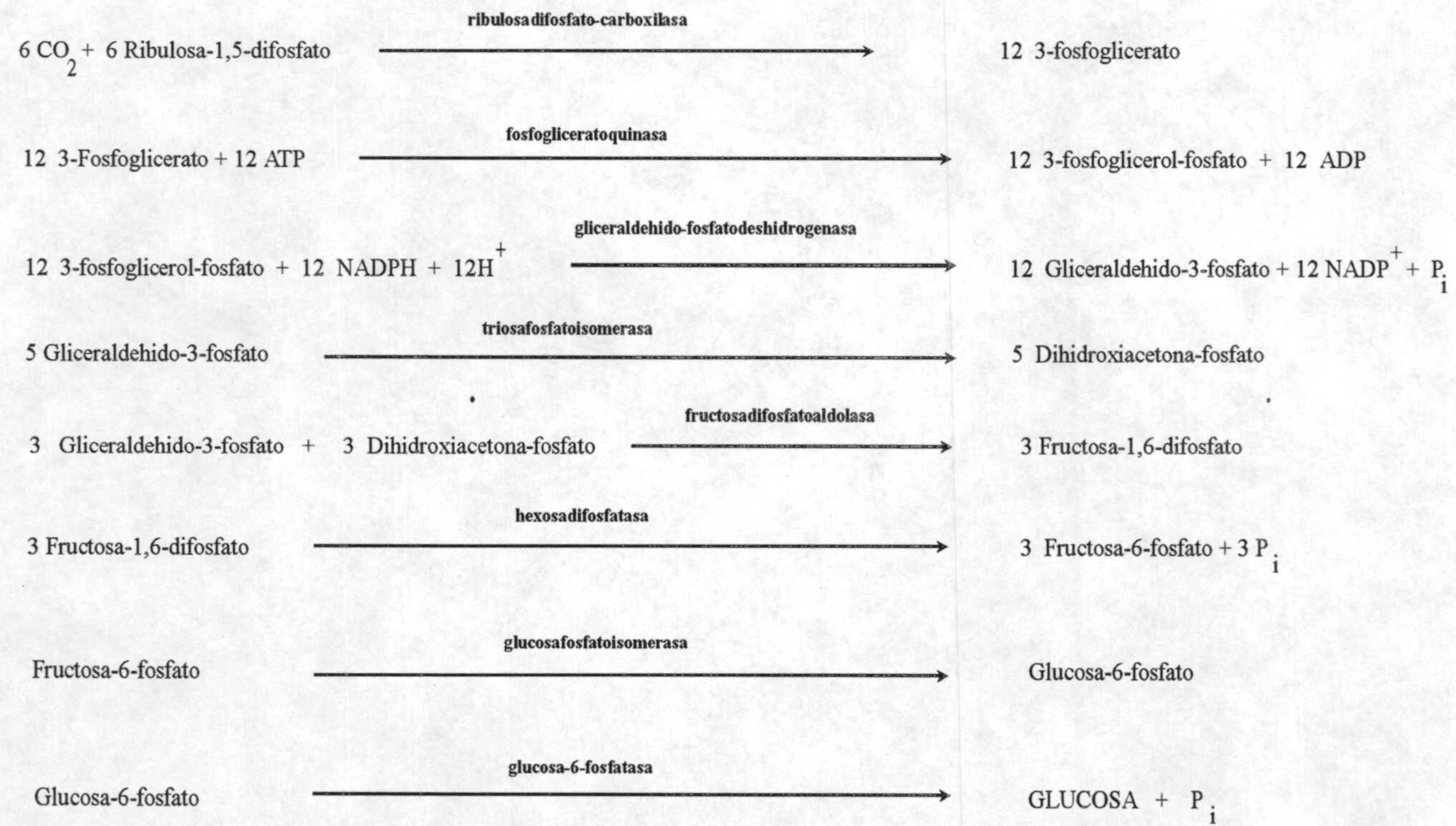
En la Tabla 2.12 se indican las reacciones completas del ciclo que se divide en tres partes fundamentales Herman.y col.(1986).

a) Carboxilación de la ribulosa 1,5-difosfato por adición de CO<sub>2</sub> para formar 2 moléculas de 3-fosfoglicerato.

Esta reacción catalizada por ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa se ha confirmado en *Chlorella*, Calvin(1956) en experimentos de corta duración utilizando <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> detecta que el primer compuesto marcado con <sup>14</sup>C es el 3-fosfoglicerato.

b) Reducción de 3-fosfoglicerato por NADPH y ATP hasta gliceraldehido-3-fosfato y su transformación continuada (Tabla 2.12 continuación.) hasta glucosa.

TABLA 2.12

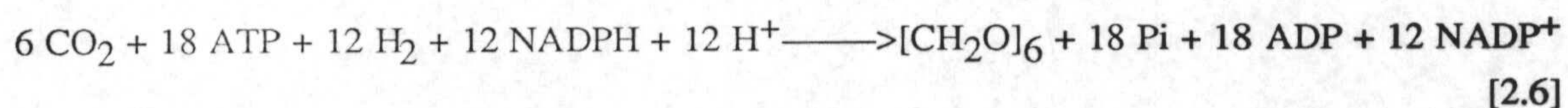


**TABLA 2.12 (continuación)**

2 Fructosa-6-fosfato + 2 gliceraldehido-3-fosfato	transcetolasa	→	2 xilulosa-5-fosfato + 2 eritrosa-4-fosfato
2 Eritrosa-4-fosfato + 2 dihidroxiacetona-fosfato	fructosadifosfatoaldolasa	→	2 sedoheptulosa-1,7-difosfato
2 Sedoheptulosa-1,7-difosfato	hexosadifosfatasa	→	2 Sedoheptulosa-7-fosfato + 2 P <sub>i</sub>
2 Sedoheptulosa-7-fosfato + 2 Gliceraldehido-3-fosfato	transcetolasa	→	2 Ribosa-5-fosfato + 2 xilulosa-5-fosfato
2 Ribosa-5-fosfato	ribosafosfatoisomerasa	→	2 Ribulosa-5-fosfato
4 Xilulosa-5-fosfato	ribulosafosfato-3-epimerasa	→	4 Ribulosa-5-fosfato
6 Ribulosa-5-fosfato	fosforribuloquinasa	→	6 Ribulosa-1,5-difosfato + ADP

c) Regeneración de la ribulosa 1,5-difosfato a partir de triosa-fosfato y su posterior utilización al comienzo del ciclo como aceptor del CO<sub>2</sub>.

Este ciclo puede resumirse en la siguiente ecuación global:



las necesidades para la formación de glucosa son 6 moles de CO<sub>2</sub>, 18 moles de ATP y 12 moles de NADPH, estos últimos se reponen mediante las reacciones luminosas de la fotosíntesis.

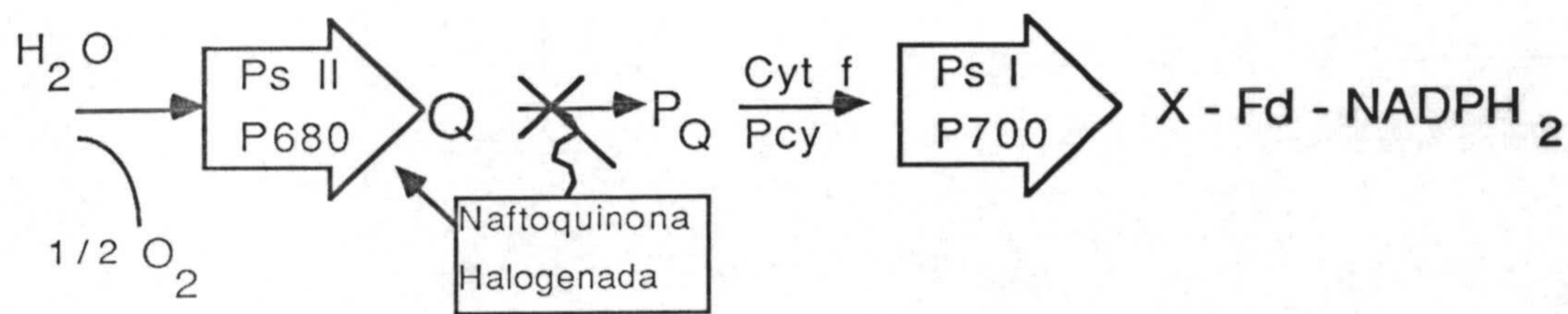
#### 2.3.1.4 Inhibición de la fotosíntesis

Con objeto de conocer todos los compuestos implicados en la fotosíntesis, se utilizan tradicionalmente sustancias que interrumpen el flujo electrónico en diferentes puntos de la cadena de transporte

Mathis (1978) utiliza un pH bajo (4.0), y altas concentraciones de TRIS (tris-hidroximetil-aminometano) 0.2 M o hidroxylamina 5 mM para producir una inhibición química del desprendimiento de O<sub>2</sub>.

Lichtenthaler y col. (1978) estudian el efecto de naftoquinonas halogenadas sobre las reacciones luminosas de la fotosíntesis e indican que el lugar de inhibición se encuentra entre el compuesto llamado Q <aceptor primario del fotosistema II> y PQ-9 <plastoquinona-9-(benzoquinona plastoquinona 9)>.

Los resultados de los estudios del transporte electrónico y de fluorescencia, después de la adición de naftoquinonas halogenadas indican dos maneras de actuación



La primera inhibe la cadena de transferencia electrónica antes de la plastoquinona, presumiblemente en un sitio similar al DCMU. La segunda tiene lugar en o cerca de los centros de reacción del FS II.

Norman y cols (1977) utilizan diversos inhibidores en sus trabajos sobre algas verdes e indican que:

El DCMU es un conocido inhibidor del FS II y del desprendimiento de oxígeno. El  $HgCl_2$  es un conocido inhibidor de la actividad de la plastoquinona, y previene la producción de hidrógeno. DBMIB <dibromo-metil-isopropil benzoquinona> es un inhibidor del potencial de transporte electrónico de la plastoquinona, inhibe la producción de hidrógeno además de su efecto inhibitorio sobre el FS II comparable al del DCMU.

De entre los diversos inhibidores conocidos es con diferencia el DCMU el más estudiado y utilizado por los investigadores en sus estudios sobre algas.

Dien King y col. (1977) estudian el efecto inhibitorio de tres herbicidas DCMU, CMU y Simazina <2-cloro-4,6-bis(etilamino)-5-triazina> sobre la fotosíntesis de *Chlamydomonas reinhardtii* y un mutante (DR-18), El efecto inhibitorio de los tres herbicidas es similar en el alga normal, el mutante resiste bien al DCMU y CMU pero menos a la Simazina.

Kreuzberg utiliza el DCMU para obtener un crecimiento anaerobio auténtico.

Sawa y cols(1982) estudian los efectos del DCMU sobre la acumulación de ATP y la fotorreducción del DCPIP <2,6-clorofenol-indofenol> por células intactas de un alga verde-azulada. La fotorreducción del DCPIP fue inhibida

completamente por la adición de DCMU 10 mM, debido al bloqueo específico de la transferencia de electrones desde el aceptor primario al secundario del fotosistema II. Sin embargo la inhibición de la acumulación de ATP en presencia de DCMU 10 mM fue menor del 20% indicando que la actividad de acumulación de ATP fue mantenida por encima del 80% del nivel normal, incluso cuando la transferencia de electrones desde el FS II al FS I se impide por el DCMU.

Govindjee y col. (1978) establecen que el DCMU bloquea el flujo electrónico desde  $Q^-$  aceptor primario del fotosistema II a R (aceptor secundario del fotosistema II).

Elchanan y cols. (1982) utilizan DCMU en el estudio del crecimiento de *Chlamydomonas reinhardtii* F-60, encontrando que una concentración de DCMU de 10 mM inhibe el 80% de la fotoevolución de  $H_2$  y mantiene prácticamente inalterada la fotoproducción de  $CO_2$ . Sin embargo, en presencia de una concentración de acetato 3mM el DCMU inhibe el 90 % de la fotoevolución de  $H_2$  y el 77% de la de  $CO_2$ . la absorción de acetato disminuye en un 66% con respecto a los experimentos sin DCMU.

Gfeller y col. (1984) proponen una vía para el carbono e hidrógeno en condiciones de iluminación durante el metabolismo de la fermentación de *Chlamydomonas reinhardtii* en condiciones anaerobias, Figura 2.6

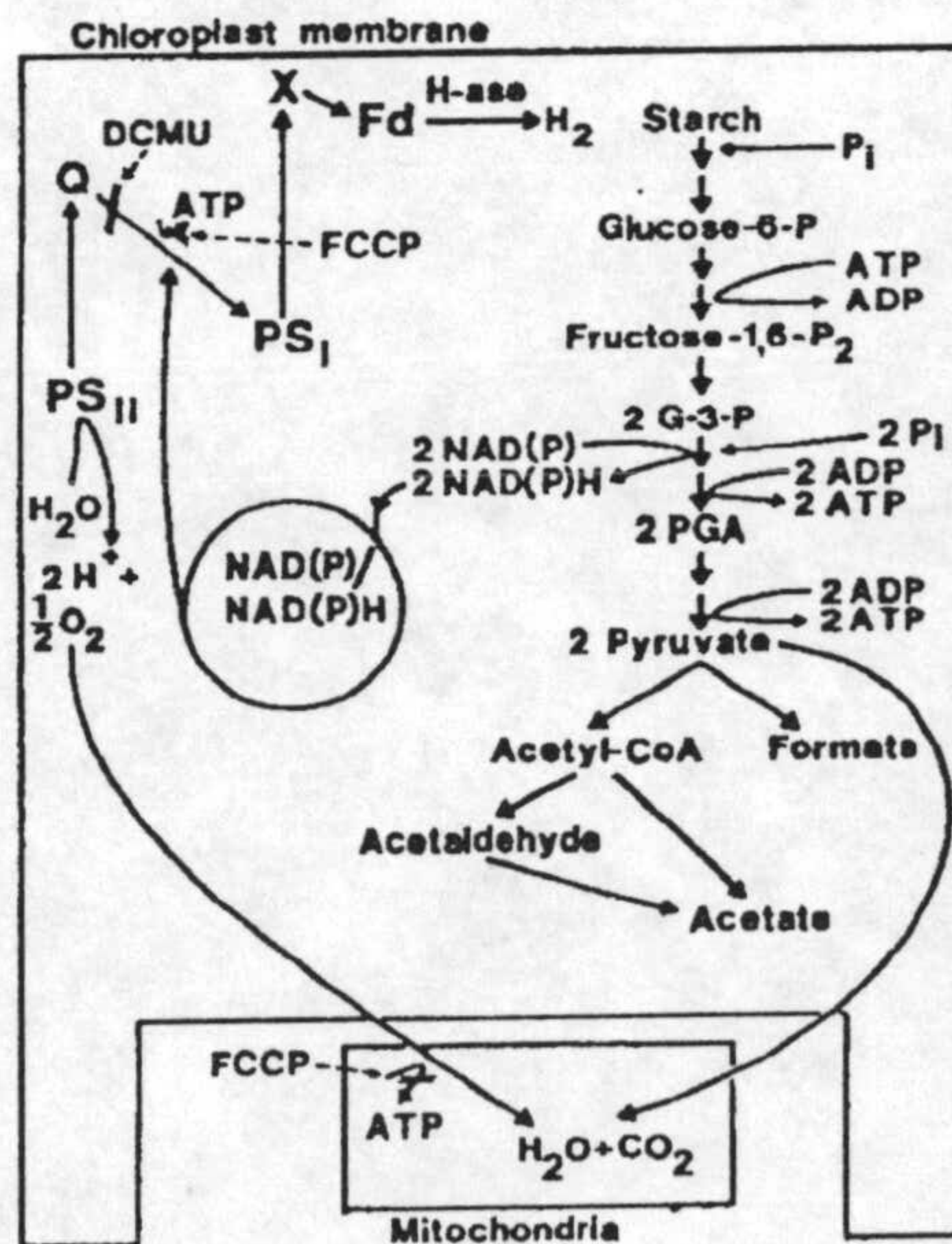


Figura 2.6

El DCMU bloquea e inhibe la fosforilación acoplada por el FCCP <carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenil>.

En ausencia de DCMU, se produce  $O_2$  fotosintético que permite la respiración mitocondrial. En presencia de DCMU se produce una auténtica anaerobiosis.

El DCMU es el inhibidor más utilizado y conocido por los diversos investigadores y ha sido el elegido para esta investigación.

### 2.3.2 METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS ORGANICOS

Los compuestos orgánicos utilizados en esta investigación, se van a diferenciar en dos grupos, en cuanto a su metabolismo.

Hexosas : Glucosa

Acidos y Alcoholes : acetato y etanol

#### METABOLISMO DE LA GLUCOSA

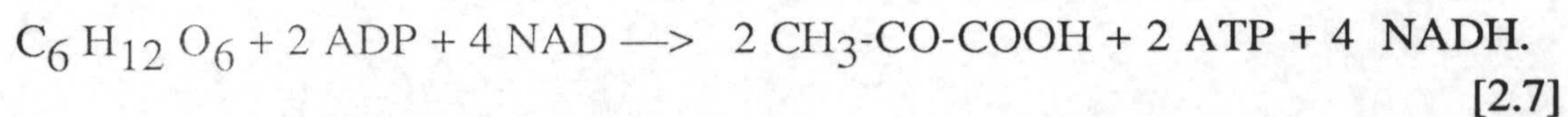
De entre las diferentes vías utilizadas por los microorganismos para degradar la glucosa, en condiciones aeróbicas, según Neilson y col. (1974) solo dos se han demostrado en algas.

- 1.- La vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)
- 2.- La vía de la Hexosa Mono-Fosfato (HMP)

Estas dos vías se recogen en las Figuras.2.7 y 2.8 hasta la formación de piruvato, Rose (1977).

#### SISTEMA EMP

Las reacciones de este sistema o vía de utilización de la glucosa se pueden resumir en:



con lo que una molécula de glucosa se convierte en dos de piruvato habiendo una ganancia neta de dos moléculas de ATP.

En condiciones aerobias, el piruvato entra en el ciclo de los ácidos



# VIA METABÓLICA DE EMBDEN- MEYERHOF-PARNAS (EMP)

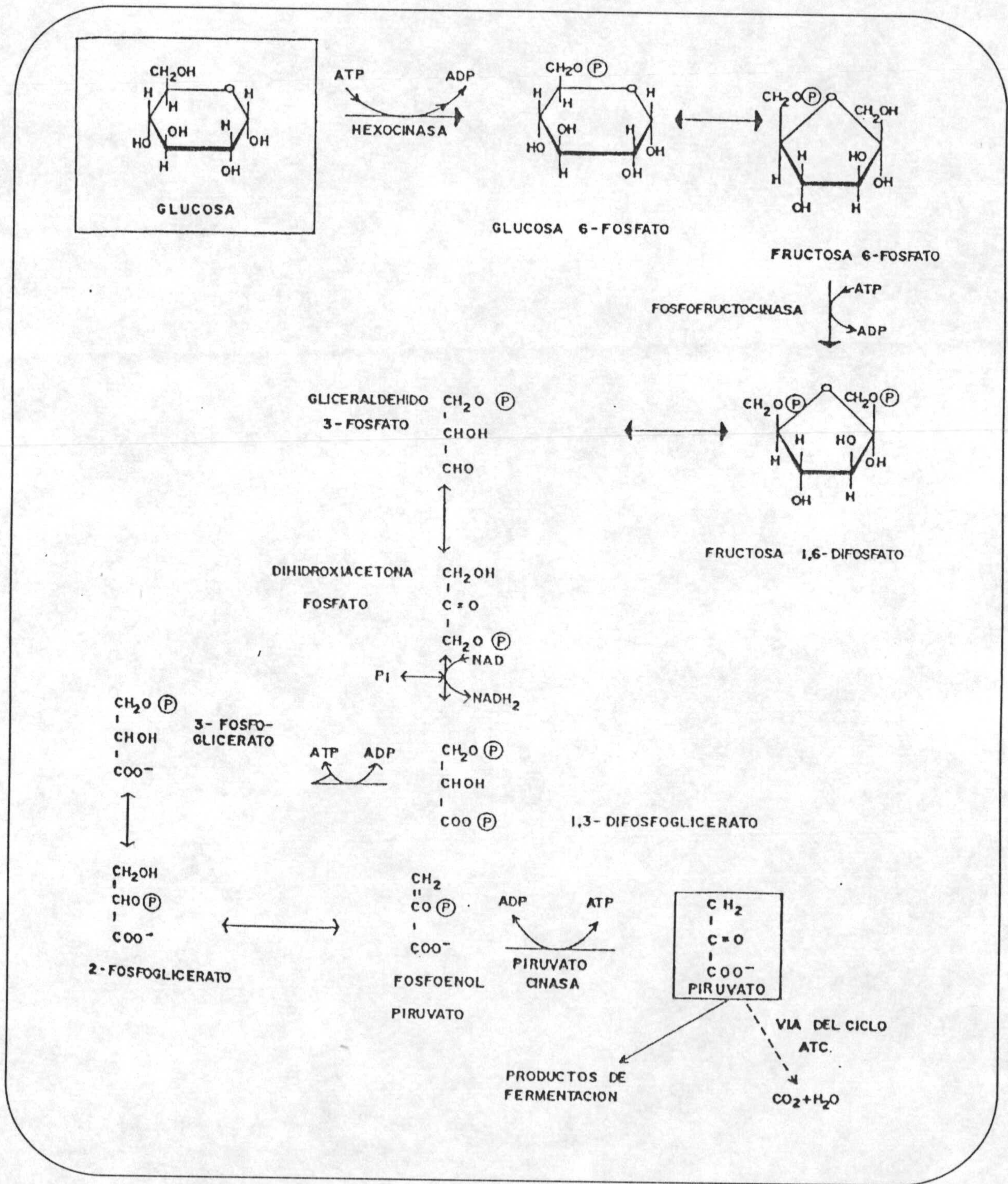


FIG. 2.7

# VIA METABÓLICA DE LA HEXOSA MONOFOSFATO (HMP)

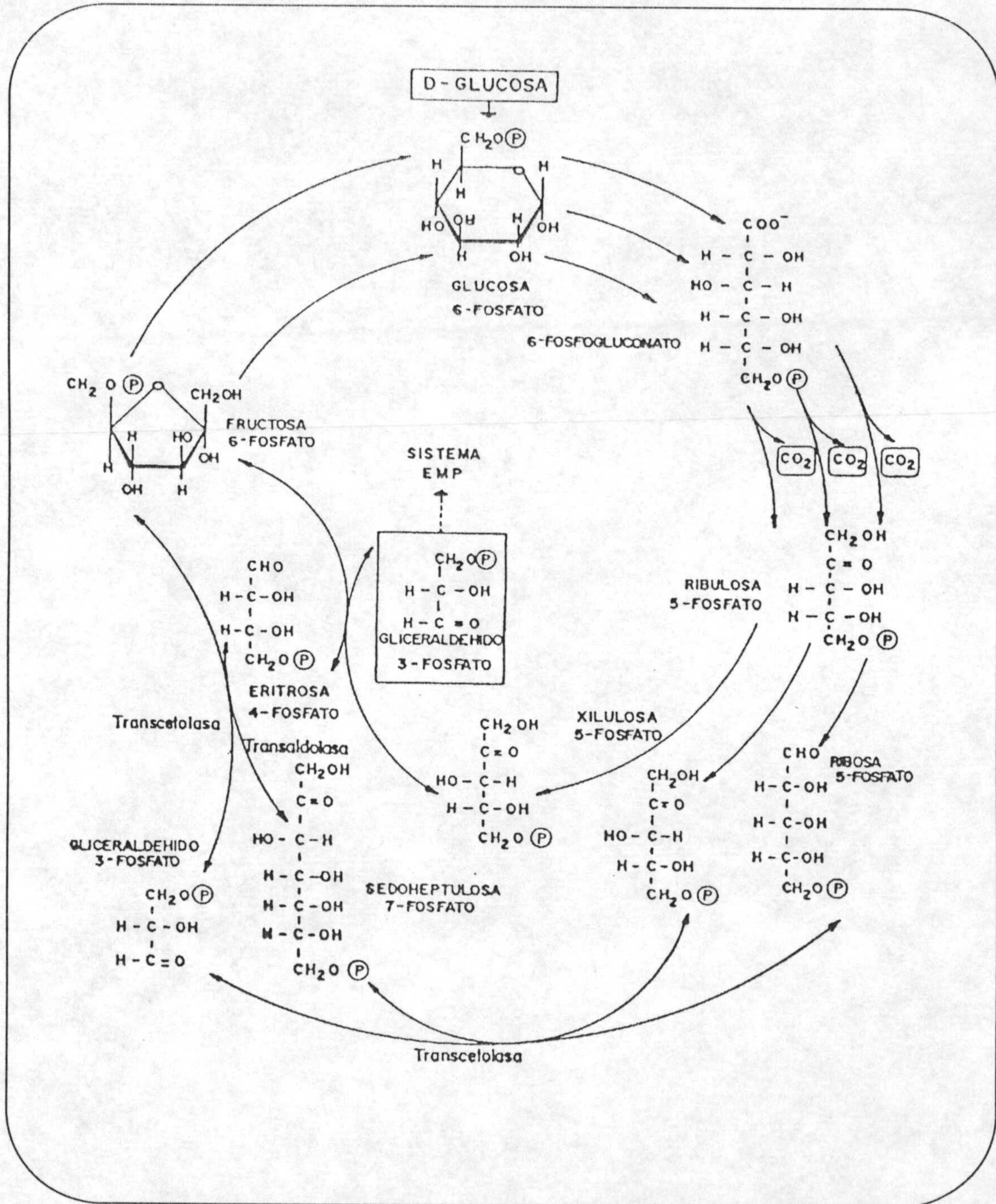
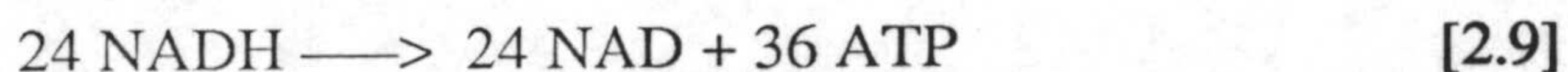


FIG. 2.8

tricarboxílicos (ATC) que se resume en:



Los electrones generados en el ciclo ATC se transfieren al oxígeno mediante la cadena de transporte electrónico. El balance total de ATP sería:



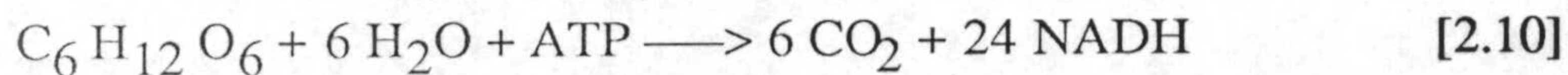
En el sistema EMP, son reversibles todas las reacciones hasta el piruvato a excepción de la fosforilación de la glucosa catalizada por la hexocinasa, la de fructosa-6-fosfato catalizada por la fosfofructocinasa y la conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato catalizada por la piruvato cinasa.

#### SISTEMA HMP

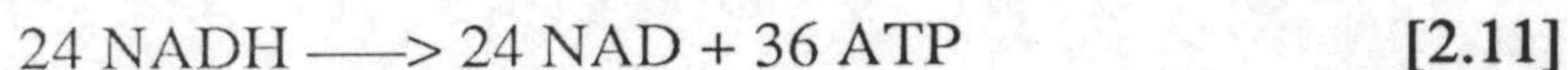
Aunque este sistema es igual al EMP en cuanto a la formación de glucosa-6-fosfato. Sin embargo, el resultado neto de estas reacciones es la conversión de una molécula de glucosa-6-fosfato en tres de dióxido de carbono y en una molécula de gliceraldehido-3-fosfato. Por tanto este sistema es la mitad de eficaz que el EMP porque hasta la formación del piruvato se produce una sola molécula de ATP.

Según Rose (1977) la función principal del HMP no es solo producir energía sino proporcionar intermedios para la síntesis de nucleótidos y  $\text{NADPH}_2$  como fuente de poder reductor.

En condiciones aeróbicas la reacción global de la vía HMP es:



y de la misma manera que en EMP.



Según lo recopilado por Neilson y col. (1974) ambos sistemas, difieren no solo en la reacción descrita y en los enzimas requeridos, sino que los átomos de

carbono de la glucosa se distribuyen de forma distinta en los productos intermedios y finales del metabolismo.

Los estudios de Neilson y col. (1974) en tres especies de algas verde-azuladas indican que una parte sustancial de la glucosa es transformada en polisacáridos y el resto es oxidada completamente por la vía HMP.

En *Euglena gracilis*, variedad *bacillaris*, y *Anabaena variabilis*, la vía HMP, es fundamentalmente la utilizada en la fotoasimilación de la glucosa.

Estos autores ponen más énfasis en la ruta de la Hexosa Mono-fosfato que en la EMP de forma general para las algas.

Para *Chlorella pyrenoidosa* y *Chlorella ellipsoidea*, creciendo en condiciones heterotróficas, Samejima y col. (1958) encuentran que de un 43-51% de la glucosa asimilada, en la primera, y de un 53-59% en la segunda se utilizan para la síntesis de material celular y el resto aparece en forma de dióxido de carbono. Este porcentaje residual es precisamente, el utilizado para generación de energía de ATP, pero no especifica nada en lo referente a la vía metabólica utilizada.

Shamala y cols.(1982a) estudian el alga *Scenedesmus acutus* en un medio que contiene glucosa marcada con  $^{14}\text{C}$ . Como resultado obtienen que este alga produce aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$  más rápidamente en presencia de luz que en la oscuridad. La glucosa se convierte a ácido glutámico, aspártico y alanina tanto en la luz como en la oscuridad. Esto avala la implicación de las reacciones de la vía EMP y el Ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

La vía EMP se considera el medio principal por el cual la glucosa se oxida en oscuridad y se sabe que es menos activa a la luz o en condiciones autotróficas. Bajo iluminación, además de los aminoácidos arriba mencionados, se encuentra también  $^{14}\text{C}$  en glicina, serina, valina y leucina; fuera de aquí la síntesis de estos aminoácidos depende de la actividad fotosintética. Serina y glicina se sabe que se producen durante el proceso de fotorrespiración, mientras valina y leucina requieren nucleótidos reducidos, NADPH, para su síntesis.

En oscuridad se limita la síntesis, de serina y glicina, y debido a la no

disponibilidad de NADPH leucina y valina no son sintetizadas. Después de 120 minutos desde la incubación con  $^{14}\text{C}$ -glucosa, la cantidad de  $^{14}\text{C}$ -glucosa asimilada fue mayor en oscuridad (46%) que en la luz (26%).

Basados en todos estos resultados Shamala y cols. (1982 c) proponen la variación del metabolismo, indicado en la Figura 2.9, para *Scenedesmus acutus* en la luz y en la oscuridad.

## METABOLISMO ANAEROBIO

Hay muy poca información acerca del metabolismo anaerobio en algas. Se producen tres tipos clásicos de productos:

- a) ácido láctico solamente
- b) ácido láctico, etanol y  $\text{CO}_2$
- c) ácido acético,  $\text{CO}_2$  y etanol

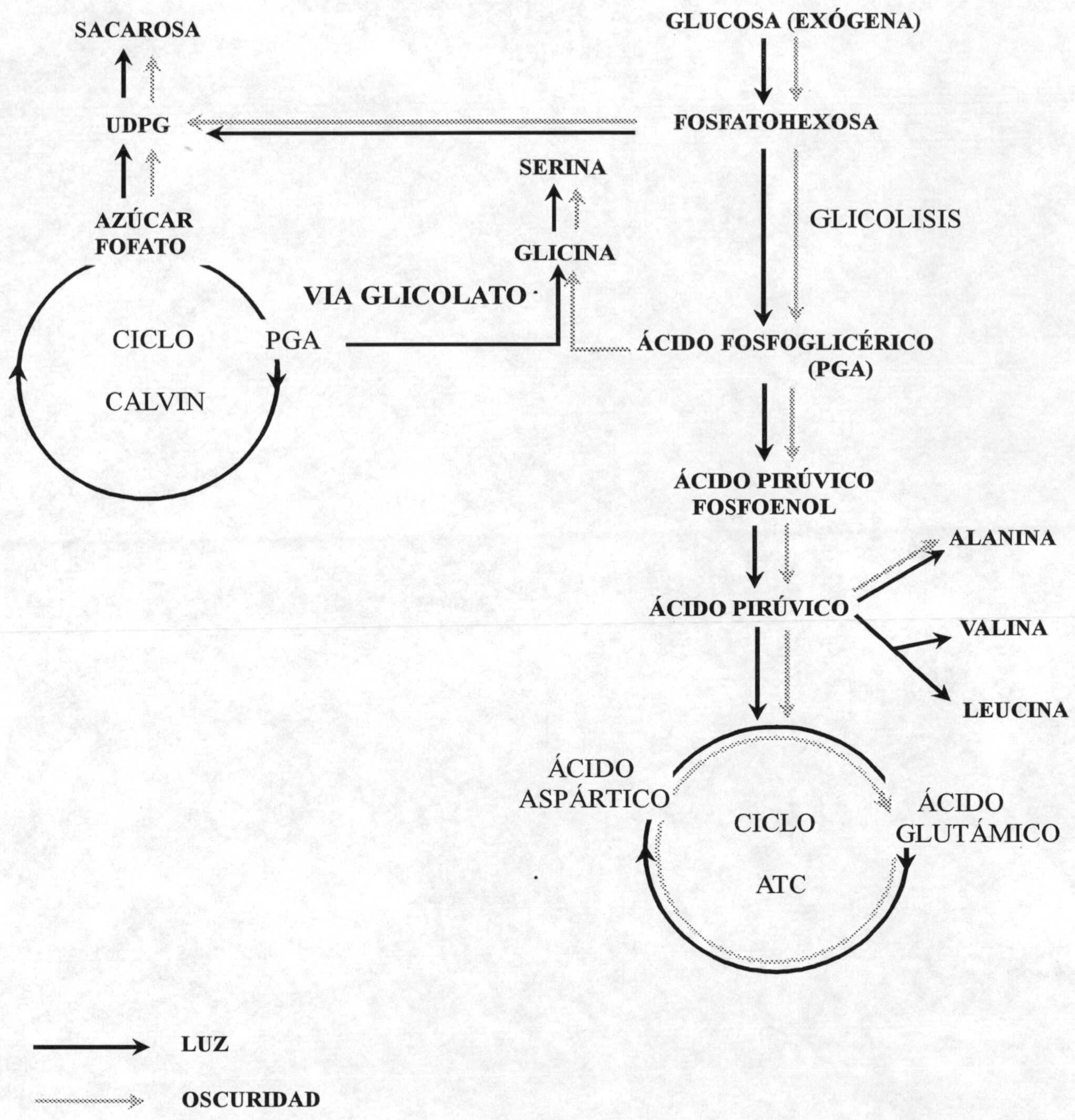
Ademas algunas algas producen hidrógeno.

Las primeras investigaciones acerca del metabolismo anaerobio en algas fueron hechas por Genevois (1927),quién observó que *Chlorella pyrenoidosa*, *Coelastrum proboscideum* y *Scenedesmus basiliensis* producen  $\text{CO}_2$  y ácidos orgánicos sin especificar a partir de diversas hexosas bajo condiciones anaerobias.

Michels (1940) muestra que *Chlorella pyrenoidosa* fermenta glucosa,a ácido láctico y otros ácidos orgánicos, mientras *Scenedesmus* produce  $\text{CO}_2$  principalmente y un de ácido orgánico sin especificar en pequeña cantidad.

En algunas especies de algas aparece hidrógeno como producto de la fermentación. Este hidrógeno depende de la actividad de la hidrogenasa, inactiva en condiciones aerobias, pero que se transforma en un enzima activo después de un periodo de anaerobiosis.

Entre las algas en las que se ha observado la actividad de la hidrogenasa podemos citar a *Chlorella pyrenoidosa* y *Chlorella vulgaris*, Kessler y col. (1960), y Damaschke (1957)



METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN :  
*Scenedesmus acutus*

FIGURA 2.9

Aunque se han hecho muy pocos ensayos es interesante considerar que algunas algas pueden crecer con carbono reducido y como fuente de energía la procedente de la fotorreducción.

Usando *Scenedesmus* (cepa D<sub>3</sub>) creciendo bajo iluminación en un medio que contiene glucosa, Gaffron (1939) encuentra ácido orgánico sin especificar (75%) y CO<sub>2</sub> procedentes de la fermentación endógena y exógena de la glucosa. *Chlorella pyrenoidosa* en las mismas condiciones también produce ácidos orgánicos.

En moderada intensidad luminosa, Gaffron y col. (1942) encuentran que las algas incrementan considerablemente la velocidad de producción de hidrógeno. Esta producción de hidrógeno se diferencia de la obtenida en oscuridad porque es insensible al dinitrofenol en concentración moderada, lo que muestra que son dos procesos distintos.

Spruitt (1962) demuestra así mismo la formación de oxígeno durante la iluminación de *Chlorella vulgaris* en anaerobiosis y que la deficiencia de manganeso no tiene efectos inhibitorios, a diferencia de la fotosíntesis.

Gaffron y col. (1942) observan "fotorreducción" de CO<sub>2</sub> con dadores de carbono orgánico como la glucosa. En condiciones anaerobicas, algunas algas como *Chlorella* son capaces de consumir oxígeno sin producir CO<sub>2</sub>.

## METABOLISMO DE ACIDOS Y ALCOHOLES

Consideraremos fundamentalmente el acetato y el etanol, que son los compuestos estudiados en esta investigación.

Según Neilson y col. (1974), el acetato se metaboliza a través de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC). Figura. 2.10.

# CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (ATC)

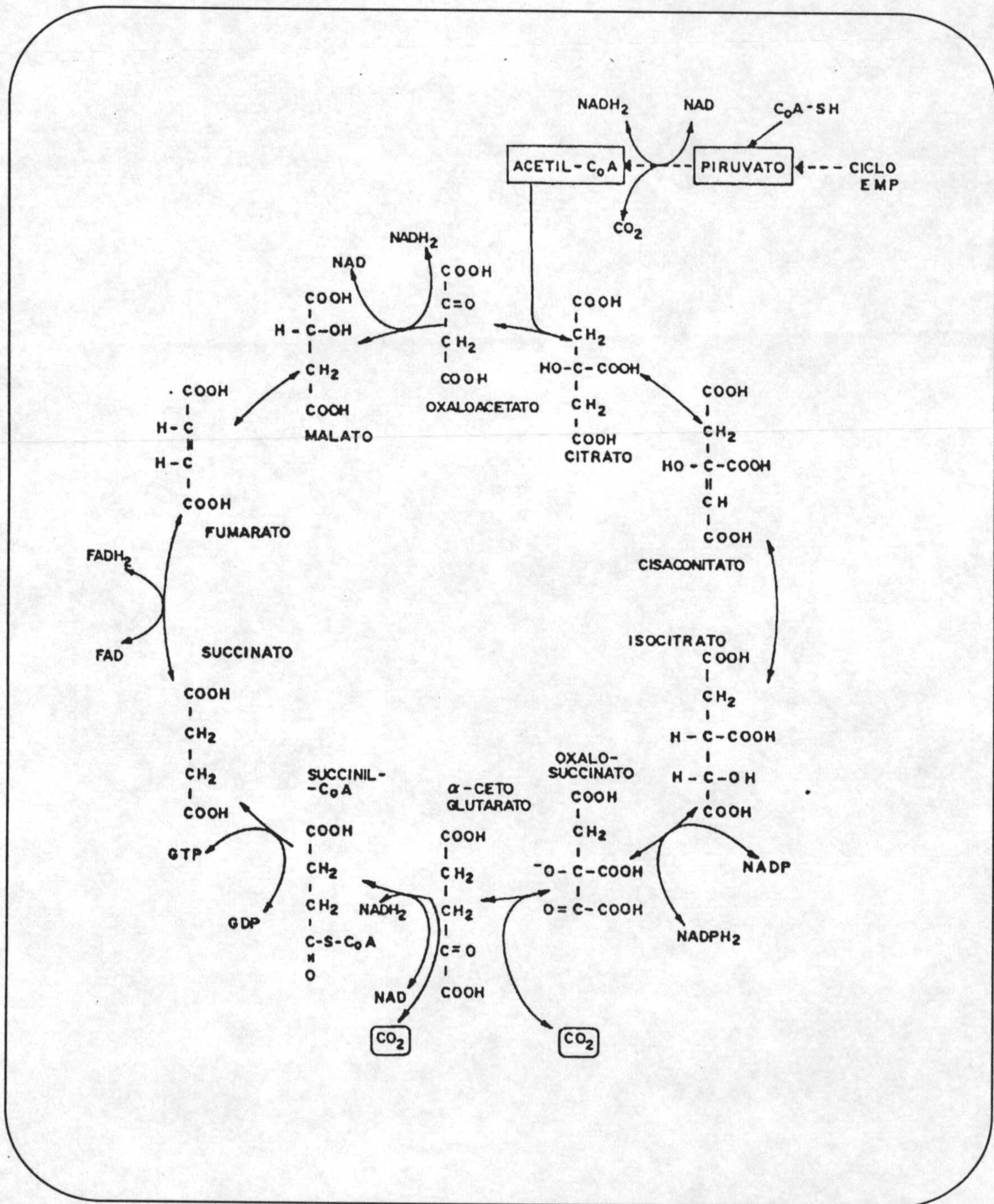


FIG. 2.10



Los microorganismos en condiciones aeróbicas no pueden carboxilar de esta forma los compuestos de dos átomos de carbono indefinidamente, y necesitan reponer los intermediarios del ciclo ATC consumidos. La síntesis de estos intermediarios, a partir de acetato, la realizan los microorganismos mediante las reacciones del ciclo del glioxilato Figura 2.11

Las funciones de estos ciclos son en cierta manera complementarias pues mientras el ciclo ATC lleva a la producción de energía mediante la combustión del acetato, el ciclo del glioxilato da lugar a síntesis de ácidos dicarboxílicos de cuatro átomos de carbono y ambos ciclos comparten algunos compuestos intermedios.

Los enzimas más importantes del ciclo del glioxilato son isocitrato liasa y acetato sintasa, enzimas encontrados en numerosas algas que crecen heterotróficamente sobre acetato como: *Chlorella vulgaris*, *Euglena gracilis*, *Prototheca zopfii* y *Chlamydomonas stellata*.

En datos recopilados por Neilson y col. (1974) para el alga *Chlorella pyrenoidosa* y trabajando con acetato marcado por  $^{14}\text{C}$  se describe que: en oscuridad se encuentra  $^{14}\text{C}$  en citrato y malato, resultados consistentes con ambos ciclos el ATC y el del glioxilato. En presencia de luz el  $^{14}\text{C}$  del acetato se encuentra en el succinato y glioxilato, lo que indica que la vía de utilización es la del ciclo del glioxilato.

El etanol es capaz de originar el crecimiento de diversas algas, que pueden vivir también a expensas del acetato. El etanol debe ser primero deshidrogenado a acetato y entonces entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, Neilson y col. (1974).

Sánchez (1986) apenas si encuentra un leve crecimiento a baja concentración de etanol del alga *Chlorella pyrenoidosa*, en la oscuridad.

## CICLO DEL GLIOXILATO

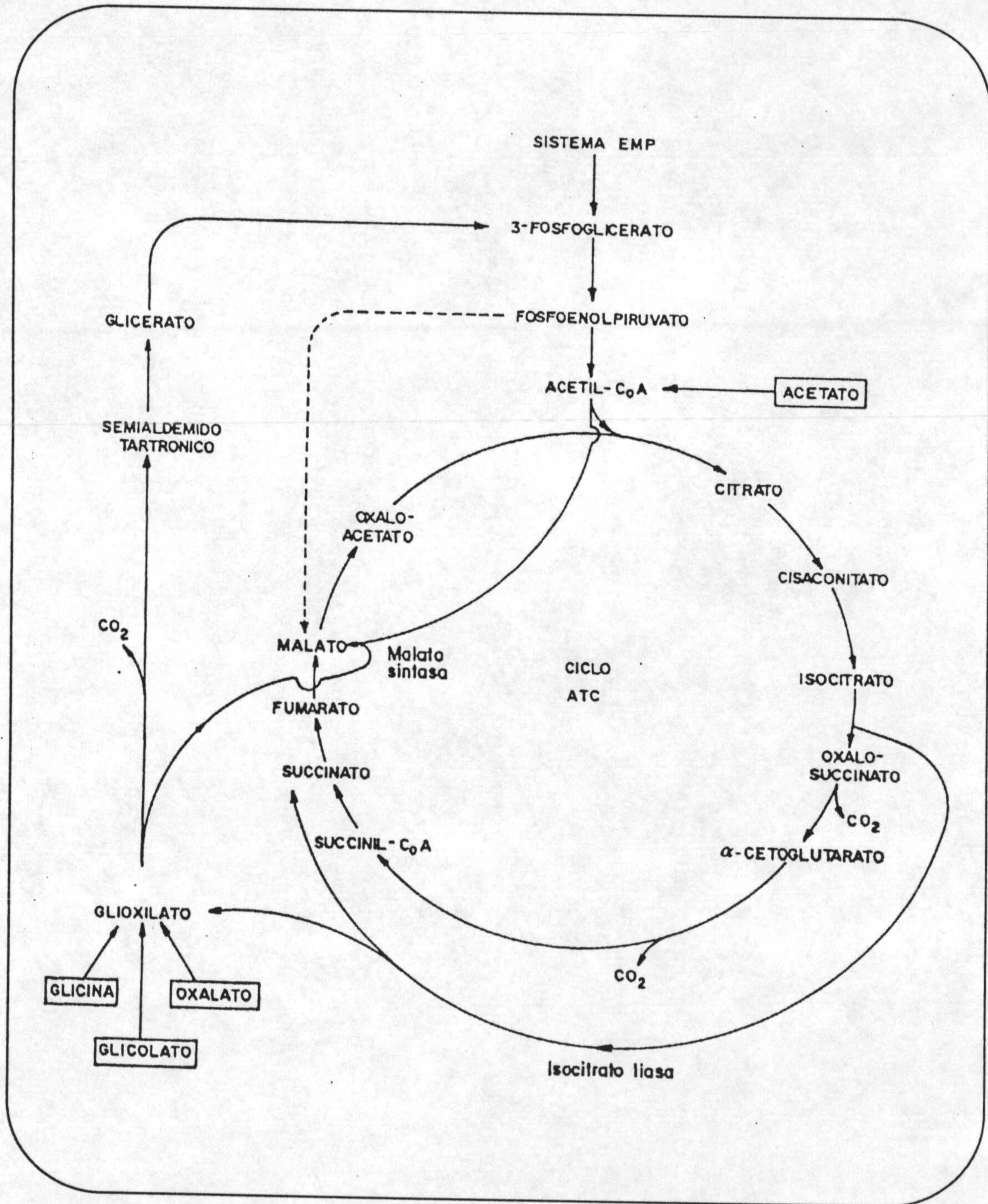


FIG. 2.11

## 2.4 INFLUENCIA DEL PH.

El pH o medida de la concentración de iones hidrógeno ejerce un efecto muy acusado sobre la velocidad específica de crecimiento y débil sobre los rendimientos en biomasa de los cultivos de algas unicelulares.

La variación de pH parece que tiene poco efecto en la distribución de los componentes macromoleculares en la célula, sin embargo produce una gran alteración en los procesos de transporte en la membrana y en las funciones metabólicas que están reguladas por el pH intracelular, Smith y col. (1973) y Raven(1974).

La mayor parte de las especies crecen en un intervalo pequeño de pH, de 4 a 5 unidades, y tienen un valor óptimo para el que la velocidad específica alcanza un valor máximo. Este máximo puede ser muy distinto para diferentes microalgas así mientras para *Chlorella* varia entre 6 y 7 para *Spirulina* puede estar comprendido entre 8 y 10.

Para relacionar la velocidad específica de crecimiento y el pH del medio de cultivo se recurre generalmente a usar expresiones deducidas de la cinética enzimática. Así, las ecuaciones normalmente utilizadas son del tipo, Moser (1985):

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{a}{[H^+]} + b [H^+]}} \quad [2.12]$$

donde  $\mu_m$  es la velocidad específica máxima y a,b constantes relacionadas con los equilibrios de disociación de nutrientes o productos que influyen en el crecimiento, o de las permeasas que intervienen en los mecanismos de transporte a través de la membrana celular.

También pueden aplicarse relaciones polinómicas del tipo, Moser (1985):

$$\mu = \mu_m (\pm \alpha_0 \pm \alpha_1 \text{pH} \pm \alpha_2 \text{pH}^2 \pm \dots) \quad [2.13]$$

que suelen conducir a buenos ajustes de los valores experimentales pero con coeficientes sin ningún significado cinético.

#### 2.4.1 Crecimiento autotrófico

Goldman y cols (1982) estudiando el crecimiento autotrófico de *Chlorella vulgaris* determinan que cuando se introduce en el cultivo aire enriquecido con un 1% de CO<sub>2</sub>, la máxima concentración de biomasa se alcanza a pH 7.9 y el intervalo de tolerancia está comprendido entre 7.6 y 10.6.

Para *Chlorella pyrenoidosa*, los cultivos en los que solo se introduce aire (0.03% CO<sub>2</sub>) muestran un ligero crecimiento, independientemente del pH del medio, en un amplio intervalo (4-10). Con concentraciones de CO<sub>2</sub> en aire del 0.1% la velocidad de crecimiento aumenta linealmente con el pH hasta valores de pH ligeramente básicos.

Al aumentar la concentración de CO<sub>2</sub> al 1% Osterlind (1950) considera el intervalo de pH de 4 a 8 como el idóneo para el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa*.

Es práctica general en el cultivo autotrófico de *Chlorella pyrenoidosa*, la utilización de aire enriquecido con un 5% de CO<sub>2</sub>. En estas condiciones, Davis y cols. (1953) en un estudio exhaustivo sobre la influencia del pH encuentran que en el intervalo de 6 a 6.5 es donde se alcanzan las máximas velocidades de crecimiento. Para el crecimiento autotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* el principal efecto del pH sobre la velocidad de crecimiento es a través de su influencia sobre los equilibrios entre el CO<sub>2</sub> libre, CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> y CO<sub>2</sub><sup>=</sup>. Esta alga es capaz de utilizar el dióxido de carbono como CO<sub>2</sub> libre o CO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> y presenta una incapacidad absoluta para asimilar CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> ó CO<sub>2</sub><sup>=</sup>.

#### 2.4.2 Crecimiento heterotrófico

Se han realizado pocos estudios acerca de la influencia del pH sobre el crecimiento heterotrófico de algas unicelulares y éstos, dirigidos fundamentalmente a la utilización de ácidos orgánicos y monosacáridos como sustratos

Los ácidos orgánicos suelen ser tóxicos en su forma sin disociar y la concentración de la misma está estrechamente relacionada con la concentración total de ácido y el pH del medio de cultivo.

Así, para *Chlorella pyrenoidosa* y *Chlorella ellipsoidea*, Samejima y col. (1958) encuentran que a pH 4.5, el acetato sódico inhibe el crecimiento a una concentración de 4 mM, aumentando este valor a 120 mM cuando el pH es 6.7.

Endo y cols. (1972) en un estudio sobre la utilización por *Chlorella vulgaris* S-50 de diferentes sustratos orgánicos, observan que a pH 6 el crecimiento se inhibe a concentraciones de acetato del orden de 80 mM. Para el crecimiento en glucosa el pH óptimo era de 6.5 tolerando el alga concentraciones próximas a los 60 g/l.

Para *Chlorella pyrenoidosa*, Sánchez .(1986), encuentra que en cultivos realizados a concentraciones iniciales de glucosa de 0.28 y 0.56 mM el pH óptimo es 6.5 y que los valores máximos de la velocidad específica de crecimiento para ambas concentraciones de glucosa son prácticamente coincidentes.

#### 2.4.3 Crecimiento Anaerobio.

Existe poca información bibliográfica sobre la influencia del pH en el crecimiento anaerobio de microalgas.

Kreuzberg estudiando el crecimiento anaerobio de *Chlorogonium elongatum* en acetato encuentra que para una intensidad luminosa constante el óptimo de producción de biomasa se produce a pH de 6.8 .

El contenido en almidón de las células está influenciado fuertemente por el pH disminuyendo desde el 50% del peso seco a pH 6.1 al 12% a pH 6.8 . Por el contrario el % de proteínas de la biomasa se mantiene al 5% del peso seco hasta pH 6.8, al aumentar el pH por encima de este valor se incrementa hasta un 75%.

Los contenidos en lípidos y clorofilas alcanzan un valor máximo a pH 6.8.

Otros autores que estudian el crecimiento anaerobio de microalgas solo indican el pH de sus experimentos. Así Gfeller y col. (1984) cultivan *Chlamydomonas reinhardtii* a pH 7.5 .

#### 2.4.4 Crecimiento mixotrófico

Apenas existen datos publicados sobre la influencia del pH en este tipo de crecimiento.

Endo y col. (1972) indican que para los crecimientos autotrófico, mixotrófico y heterotrófico de *Chlorella regularis* S-50 el pH óptimo está comprendido entre 6 y 7.

Dada la escasez de información es interesante señalar los pH de trabajo de algunos autores:

<u>Autor</u>	<u>microalga</u>	<u>pH</u>
Ogawa y col. (1981)	<i>Chlorella regularis</i>	6.0
Lalucats y cols. (1984)	<i>Chlorella sp. V179</i>	7.0
Samejima y col. (1956)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	5.6-5.8

## 2.5 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

La temperatura es una variable de operación que afecta notablemente al crecimiento de todos los microorganismos, y cada uno de ellos se caracteriza por poder crecer solo en un intervalo restringido de la misma.

La mayor parte de las microalgas son microorganismos mesófilos y pueden crecer en un intervalo de temperatura comprendido entre 25 y 40°C. Marre (1962) indica que las temperaturas óptimas de crecimiento, fotosíntesis y respiración para *Chlorella pyrenoidosa* están entre los intervalos 25-26 °C, 32-35 °C y 30°C cuando crece autotróficamente.

Existen excepciones como *Chlorella pyrenoidosa* 7-11-05, especie termófila, cuya temperatura máxima de crecimiento es de 42°C y las temperaturas óptimas de crecimiento, fotosíntesis y respiración 38-39°C, 40-42°C ,40-42°C exceden considerablemente los valores anteriormente indicados

En un cierto margen de temperaturas la velocidad de crecimiento aumenta con ésta. Es frecuente en este sentido el uso del llamado "Coeficiente de temperatura",  $Q_{10}$ , definido como el cociente entre la velocidad de crecimiento a una temperatura y la velocidad a una temperatura 10°C menos.

$$Q_{10} = \frac{\mu_T}{\mu_{T-10}} \quad [2.13]$$

Estos valores del coeficiente de temperatura se han determinado para el crecimiento de distintos microorganismos y al igual que para las reacciones químicas suele estar comprendido entre 1.05 y 4, Rose (1977).

En el estudio de la influencia de la temperatura, en el intervalo de 25 a 35°C, sobre el crecimiento autotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* Martínez (1980) determina que la velocidad específica de crecimiento  $\mu_m$  pasa por un máximo alrededor de 30 °C.

Lee y cols. (1984) encuentran que la velocidad específica máxima de crecimiento,  $\mu_m$ , crece uniformemente con la temperatura en el rango de 25-37 °C para los cultivos de *Chlorella vulgaris* (211/8k) y hasta 35 °C para *Chlorogonium sp*; un posterior incremento de la temperatura hasta 40°C, origina una disminución de  $\mu_m$  para ambos organismos

En la Tabla 2.13 se indican distintos tipos de microalgas, así como las temperaturas normalmente utilizadas en crecimiento heterótrofico.

TABLA 2.13

Crecimiento heterotrófico-Temperatura

<u>Alga</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Referencia</u>
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	25	Samejima y col.(1958)
.. <i>vulgaris</i> Beyerinck	25	Karlander y col.(1965)
.. <i>pyrenoidosa</i>	24	Rodríguez (1966)
.. <i>vulgaris</i> ,211/8k	25	Griffiths (1970)
.. <i>fusca</i> , 1-8b	30	Galloway y cols. (1974)
.. <i>regularis</i> S-50	36	Endo y col. (1977)
.. <i>vulgaris</i> ,211/8k	30	Ogawa y col. (1981)
<i>Scenedesmus acutus</i> , c-63	30	Ogawa y col. (1981)
<i>Anabaena</i> , sp	24	Sahu y col. (1981)

Por otra parte Sánchez(1986) encuentra para el crecimiento heterotrófico de la misma alga utilizada en esta investigación que la temperatura óptima se encuentra en las proximidades de 30°C .Ogawa y col. (1981) para el crecimiento anaerobio de *Chlorella vulgaris*(211/8K) utilizan como temperatura de trabajo 30°C.

Existe poca información bibliográfica acerca de la influencia de la temperatura sobre el crecimiento mixotrófico de algas unicelulares. Shamala y cols. (1982a) estudian los efectos de la temperatura sobre la absorción de monosacáridos por *Scenedesmus acutus* en períodos luminosos y oscuros. La temperatura óptima para la absorción es de 30°, a 10°C no tiene lugar y por encima de 30°C la



absorción de glucosa y fructosa fué más alta en oscuridad que en presencia de luz.

De forma análoga a lo realizado para el crecimiento heterotrófico, en la Tabla 2.14 se recogen las temperaturas indicadas por diferentes autores para el crecimiento mixotrófico de varias especies de algas.

TABLA 2.14

Crecimiento mixotrófico-Temperatura

<u>Alga</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Referencia</u>
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	25	Samejima y col. (1958)
.. <i>pyrenoidosa</i>	24	Rodríguez (1966)
.. <i>regularis S-50</i>	36	Endo y col. (1972)
.. <i>vulgaris,</i>	30	Ogawa y col. (1981)
<i>Scenedesmus acutus</i>	30	Ogawa y col. (1981)
<i>Chlorella sp Vj79</i>	30	Lalucats y cols.(1983)
.. <i>regularis</i>	36	Endo y cols.(1977)
.. <i>pyrenoidosa</i>	25-28	Hu y cols(1978)

Por otra parte hay que destacar que una variación de la temperatura en el cultivo no influye solo en los procesos internos del alga sino también indirectamente a través del medio de cultivo, ya que las solubilidades de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> dependen de la temperatura.

Experimentalmente se ha comprobado, en la mayoría de los microorganismos, que la representación de la velocidad específica de crecimiento,  $\mu$ , frente a la temperatura, T, origina curvas similares a la indicada en la Figura 2.12

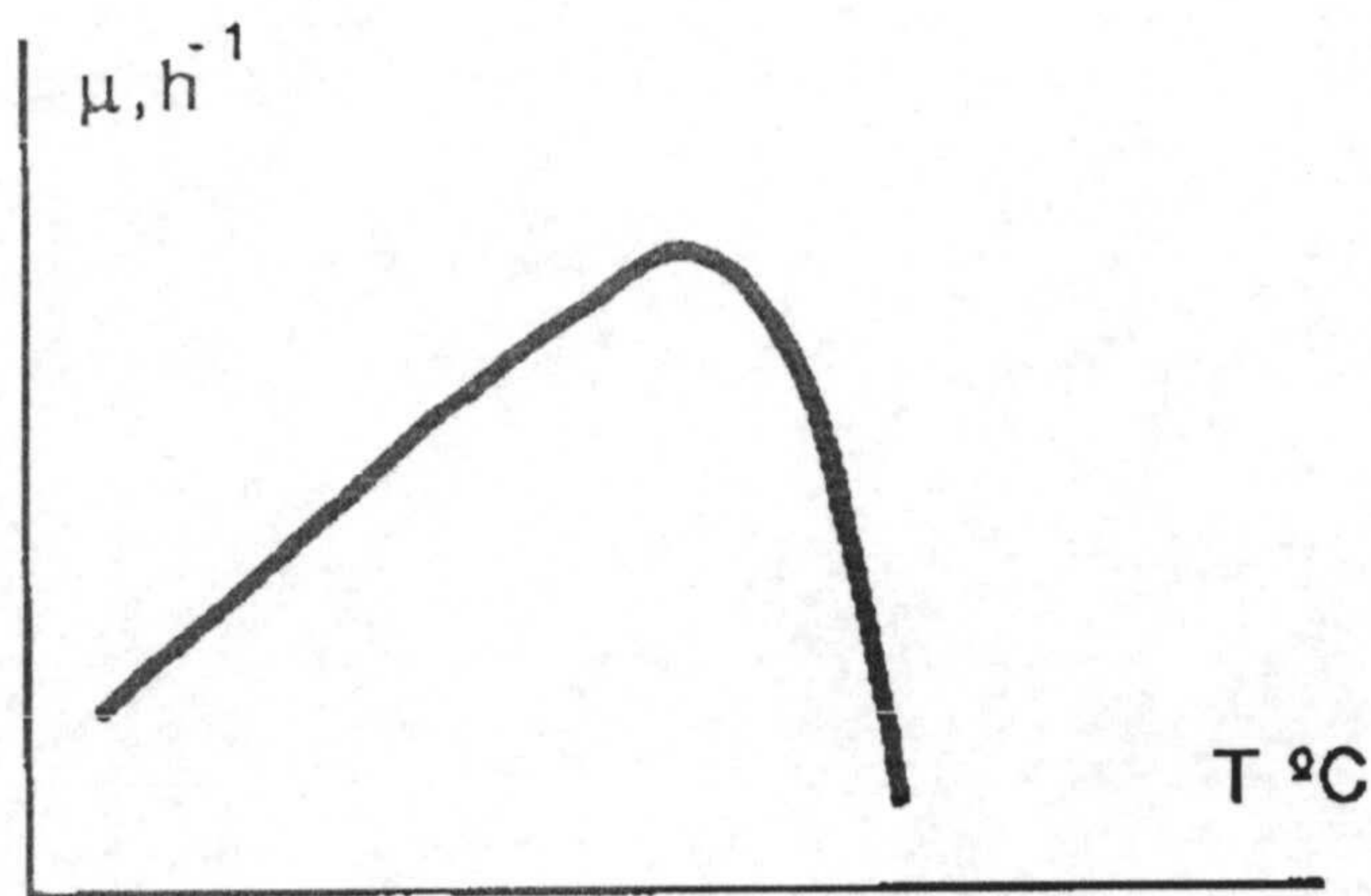


Fig 2.12

El comportamiento indicado en esta figura donde  $\mu$  velocidad efectiva de crecimiento representa los efectos combinados de crecimiento y muerte celular podría ajustarse mediante una expresión del tipo, Moser(1985):

$$\mu = \mu_0 e^{(-E_a/RT)} - \mu_d e^{(-E_d/RT)} \quad [2.14]$$

siendo  $E_a$  y  $E_d$  energías de activación aparente para las zonas ascendente y descendente de la Figura 2.12, en cal/mol, y  $\mu_0, \mu_d$  dos factores preexponenciales característicos del modelo.

Valores típicos de energía de activación,  $E_a$ , para el crecimiento oscilan entre 13 a 17 Kcal/mol según el organismo y entre 70-90 Kcal/mol las correspondientes al proceso de muerte celular,  $E_d$ . Estos valores determinan que la velocidad de muerte aumente más rápidamente con la temperatura que la velocidad de crecimiento, originando este hecho un rápido descenso de la velocidad global a temperaturas superiores a la óptima, tal como se observa en la Figura 2.12.

La variación de la temperatura en un cultivo también afecta a la conversión

del sustrato, fuente de carbono y energía, en material celular. La conversión máxima suele ocurrir a temperatura algo menor que la que origina una velocidad de crecimiento máxima.

La temperatura de un cultivo afecta al crecimiento, a la conversión de sustrato y a la síntesis de producto de forma algo distinta, por lo que la temperatura de trabajo ha de optimizarse en función del fin perseguido.

## 2.6 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE ALGAS UNICELULARES

El crecimiento de un microorganismo, en discontinuo, con unas fuentes de materia y energía apropiadas, atraviesa diferentes fases que reflejan los cambios en la biomasa formada y en el medio de cultivo, Figura 2.13.

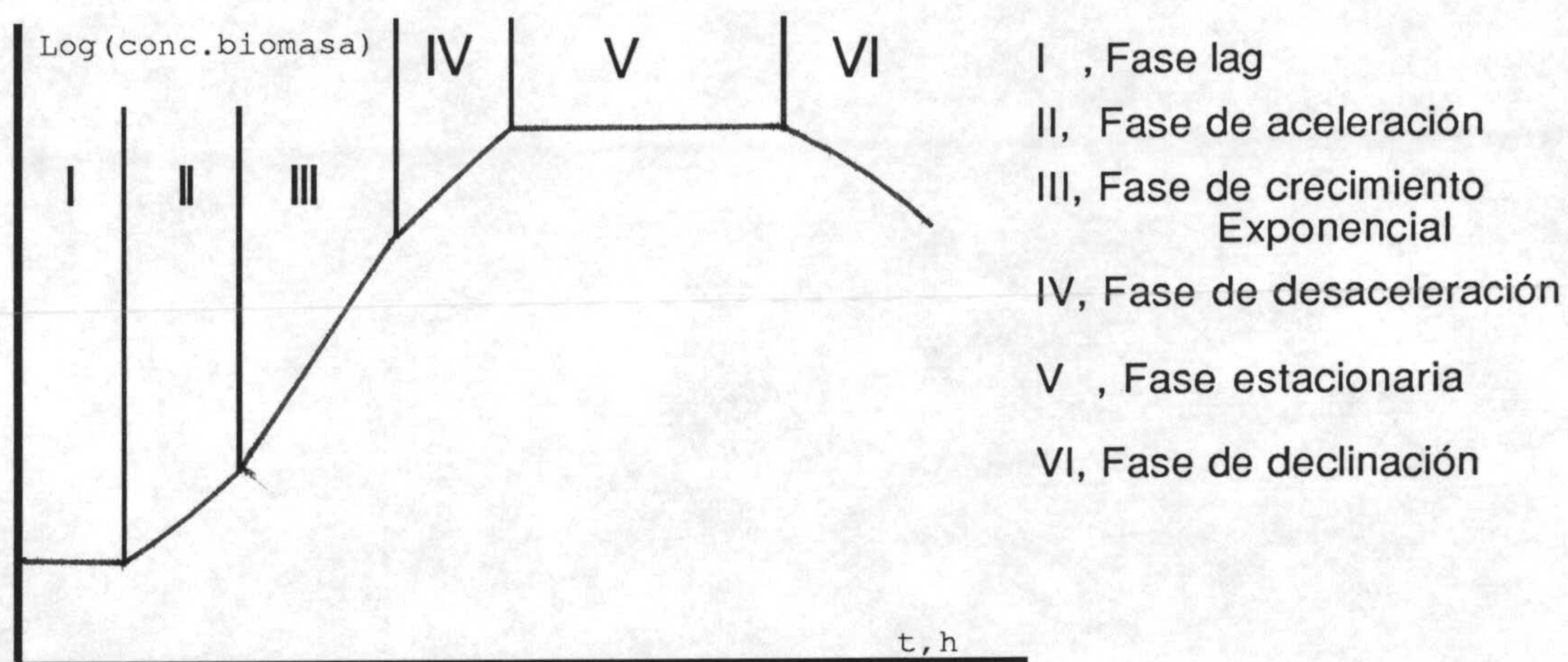


FIG 2.13

Durante la "Fase lag" o período de adaptación, no hay crecimiento celular neto, las reacciones que ocurren a nivel molecular no son bien conocidas siendo considerable la síntesis de RNA. La duración de esta fase es difícil de predecir y depende no sólo del número de células inoculadas sino también de sus características fisiológicas, designadas como "edad" o "estado fisiológico".

La fase de aceleración es un intervalo de corta duración entre las fases lag y exponencial, no está bien descrita ni matemáticamente ni biológicamente, y en ella

la razón células hijas/población total suele alcanzar el valor 0.5.

Las zonas exponencial y estacionarias tienen un mayor interés desde el punto de vista cinético ya que permiten evaluar la dependencia de la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento celular con las condiciones de cultivo.

En la zona exponencial no hay limitación alguna al crecimiento y el microorganismo crece a su velocidad máxima  $\mu_m$ . Cuando un nutriente esencial, tras su consumo progresivo, empieza a limitar el crecimiento la velocidad disminuye constantemente y se anula al consumirse totalmente el nutriente. La población permanece estacionaria y las células comienzan a metabolizar sus recursos produciéndose a continuación la fase de declinación o muerte.

Cuando el nutriente que limita el crecimiento se aporta al cultivo a velocidad constante: gases ( $O_2, CO_2$ ) ó luz, aparece una fase lineal al final de la fase de crecimiento exponencial, durante la cual la velocidad de crecimiento es constante y se mantiene hasta que empieza a limitar el crecimiento otro nutriente contenido en el medio de cultivo.

#### 2.6.1.- MODELOS CINÉTICOS

En el análisis del cultivo de algas unicelulares se utiliza como parámetro cinético la velocidad específica de crecimiento,  $\mu$ , definida como velocidad de crecimiento por unidad de biomasa:

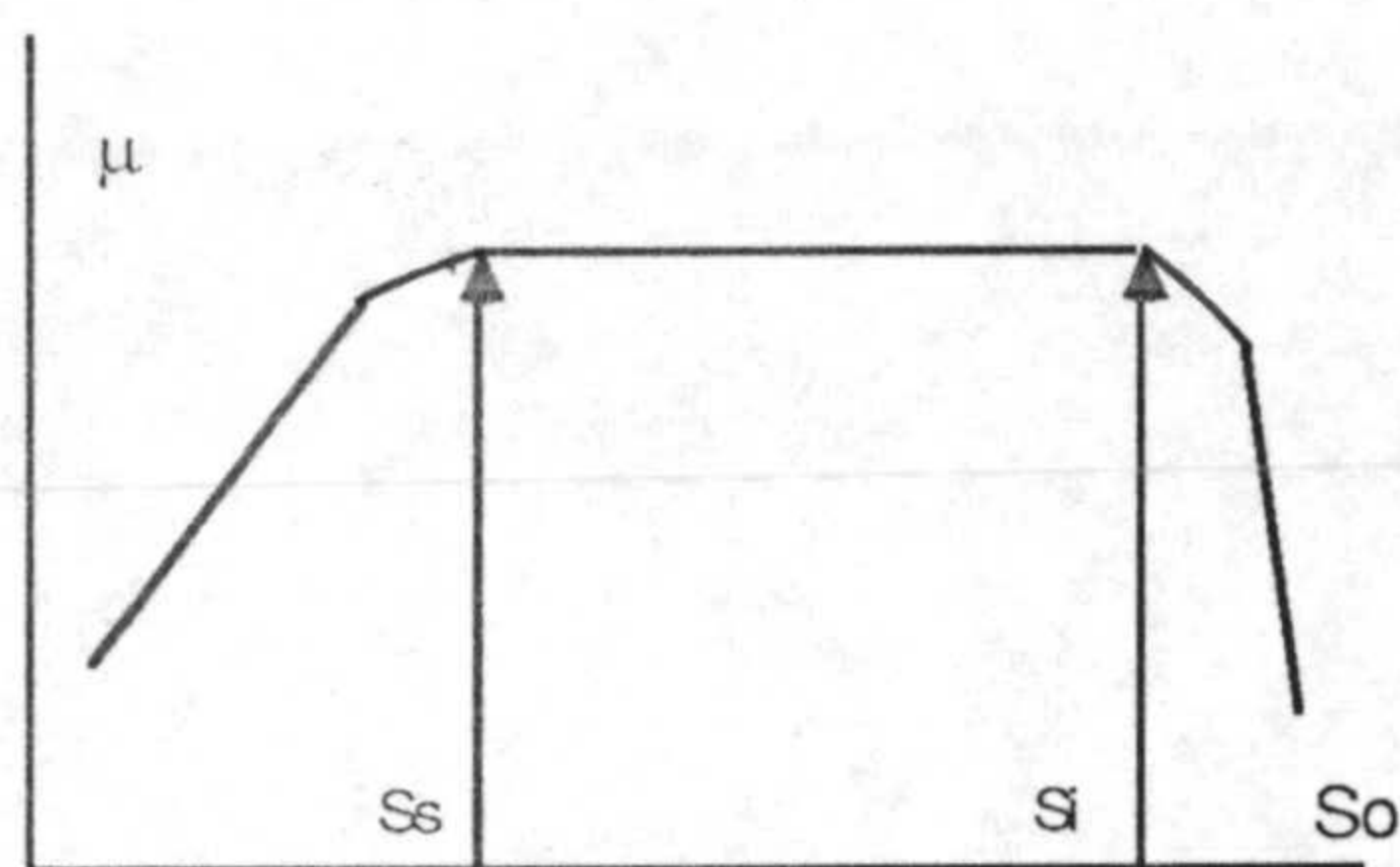
$$\frac{1}{c} \frac{dc}{dt} = \mu \quad [2.15]$$

Esta velocidad específica,  $\mu$ , representa un valor medio de la cinética de los procesos que constituyen el crecimiento global, es decir, el crecimiento en número de células y el crecimiento de estas células individuales y varía con el estado fisiológico de las mismas y con el estado del medio que las rodea.

Existen diferentes modelos para explicar la influencia de las distintas

variables sobre la velocidad específica de crecimiento,  $\mu$ , y han sido clasificados en modelos estructurados y modelos no estructurados, Fredrickson (1976). Con fines prácticos se suelen utilizar los modelos no estructurados ya que no requieren el conocimiento de las variables fisiológicas de las células y se asume por tanto que  $\mu$  es sólo función de las variables ambientales.

Si todas estas variables permanecen constantes y sólo varía la concentración de un sustrato,  $\mu$  varía con la concentración del mismo en la forma indicada en la figura:



donde  $S_s$  representa la concentración de saturación, a partir de este valor un aumento en la concentración de este sustrato no modifica el valor de  $\mu$ . A valores muy elevados se suele observar un efecto inhibitorio del crecimiento.

En el intervalo de concentraciones comprendido entre  $S_s$  y  $S_i$  el sustrato considerado no limita el crecimiento, permaneciendo  $\mu$  a su valor máximo, por debajo de  $S_s$  existe limitación del crecimiento y la velocidad específica disminuye conforme lo hace la concentración del mismo.

Aunque la luz podría considerarse un sustrato más, su forma de aporte, en continuo, y su heterogeneidad espacial dentro de los cultivos aconseja un estudio por separado de los modelos cinéticos que describen la influencia de sustratos disueltos y luz.

### 2.6.1.1.- Influencia de la concentración de sustrato disuelto sobre el crecimiento.

#### *Modelos de limitación por sustrato.*

En la Tabla 2.15 se indican algunos de los modelos propuestos en la bibliografía para describir el efecto de la limitación del crecimiento por un único sustrato, cuando las demás variables ambientales permanecen fijas.

El más utilizado y representativo sigue siendo el modelo de Monod. Este modelo basado en la cinética enzimática lo estableció Monod (1942) y se define por las ecuaciones siguientes:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad [2.16]$$

donde  $\mu_m$  es la máxima velocidad específica de crecimiento que se alcanza en las condiciones ambientales prefijadas y  $K_s$  es la constante de saturación del nutriente limitante o concentración del mismo a la cual la velocidad específica de crecimiento es la mitad de  $\mu_m$ .

La ecuación de Monod representa una hipérbola rectangular y por tanto este modelo no reproduce el efecto inhibitor del crecimiento a altas concentraciones de sustrato.

Entre los modelos indicados en la Tabla 2.15 existen algunos de fácil aplicación como el modelo de dos parámetros de Teissier (1936) y el modelo de tres parámetros de Moser (1958). La diferencia entre el modelo de Monod y el exponencial de Teissier estriba en que este último partiendo de la misma pendiente en el origen, de la gráfica  $\mu - S$ , alcanza antes el valor máximo,  $\mu_m$ . El modelo de Moser permite el ajuste a formas sigmoidales según el valor de  $n$  y una aproximación más lenta al valor  $\mu_m$ .

Otros modelos de tres parámetros indicados en la Tabla 2.15 son los de Powell (1967) y Dabes y cols. (1973). El primero engloba en la constante  $K_d$

TABLA 2.15

MODELOS DE LIMITACIÓN POR SUSTRATO

<u>MODELO</u>	<u>ECUACIÓN</u>
Monod (1942)	$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$
Teissier (1936)	$\mu = \mu_m \left(1 - e^{-\frac{S}{K_s}}\right)$
Moser (1958)	$\mu = \frac{\mu_m S^n}{K_s + S^n}$
Powell (1967)	$\mu = \frac{\mu_m S}{(K_s + K_d) + S}$
Dabes y cols. (1973)	$S = \mu K + \frac{\mu - K_s}{\mu_m - \mu}$



factores tales como la permeabilidad de la pared celular, la difusión del sustrato y el tamaño de la célula. El segundo sugiere que a bajas concentraciones de sustrato la velocidad de crecimiento viene fijada por varias reacciones enzimáticas en serie.

Todos estos modelos, al igual que el de Monod, adolecen del defecto de no poder reproducir la inhibición a altas concentraciones de sustrato.

Por tanto, con fines de aplicación práctica es el modelo de Monod el que suele utilizarse para explicar la influencia de la concentración de sustrato en la velocidad específica, en el margen de concentraciones del mismo en el que no se origina inhibición del crecimiento celular.

#### *Modelos de inhibición por sustrato*

La mayor parte de los modelos de inhibición del crecimiento de microorganismos que se indican en la Tabla 2.16 se han obtenido a partir de los distintos mecanismos de inhibición de la cinética enzimática.

Andrews (1968), Pawlowsky y cols (1973), Jones y cols (1973) y Chi y col (1976) utilizan, logrando un buen ajuste de sus datos experimentales, la ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_s/S + S/K_i} \quad [2.17]$$

donde  $\mu$ ,  $S$ ,  $\mu_m$  y  $K_s$  tienen el mismo significado que en el modelo de Monod y  $K_i$  se denomina constante de inhibición.

TABLA 2.16

MODELOS DE INHIBICIÓN POR SUSTRATO

<u>MODELO</u>	<u>ECUACIÓN</u>
Andrews (1968)	$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}}$
Webb (1963)	$\mu = \frac{\mu_m S (1 + \beta \frac{S}{K'_s})}{S + K_s + \frac{S^2}{K'_s}}$
Yano y cols (1966)	$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_s}{S} + \sum (\frac{S}{K_i})^j}$
Aiba (1968)	$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} e^{-\frac{S}{K_i}}$
Tipo Teissier	$\mu = \mu_m [e^{-\frac{S}{K_i}} - e^{-\frac{S}{K_s}}]$

Se han propuesto otros modelos de inhibición por sustrato, similares al anterior, con alguna modificación y deducido también de la cinética enzimática. Entre ellos cabe mencionar el representado por la ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_s/S + S^2/K_i} \quad [2.18]$$

La diferencia con la ecuación del modelo de Andrews está en el sumando  $S^2/K_i$ . Este término indica un mayor grado de inhibición del sustrato. Ambas ecuaciones [2.17] y [2.18] responden al modelo de Yano y cols, siendo el exponente  $j$  1 y 2 respectivamente.

#### *Modelos de toxicidad del sustrato*

En algunos casos un sustrato orgánico, o un producto excretado por la célula y acumulado en el medio de cultivo son tóxicos pudiendo causar la muerte de las células. Las ecuaciones:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{S + K_s} - K_d S \quad [2.19]$$

$$\mu = \frac{\mu_m S}{S + K_s} - K_d S^2 \quad [2.20]$$

representan dos modelos que tienen en cuenta el efecto tóxico del sustrato, donde  $K_d$  es la denominada constante de muerte.

La segunda ecuación es una modificación de la misma e implica un mayor grado de toxicidad del sustrato. Ambas ecuaciones se reducen a la ecuación de Monod cuando el efecto tóxico no existe.

Tseng y col. (1975) proponen un modelo similar a los anteriores,

representado por la ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} - K_i (S - S_c) \quad [2.21]$$

siendo  $S_c$  la concentración de sustrato por encima de la cual se manifiesta su toxicidad

#### 2.6.1.2.- Influencia de la intensidad de iluminación.

En cultivos discontinuos, aunque la intensidad de iluminación incidente permanezca constante, la intensidad en el medio de cultivo varía con la posición y con el tiempo debido al aumento de biomasa. Por estas circunstancias se alcanza generalmente una concentración celular a la cual toda la energía radiante incidente es absorbida en el recipiente de cultivo y a partir de este momento la velocidad de crecimiento se mantiene constante determinada por la velocidad de aporte de esta energía. Esta región, denominada zona lineal de crecimiento, aparece siempre en cultivos discontinuos autotróficos a continuación de la fase de crecimiento exponencial siempre y cuando no haya limitación o inhibición por los nutrientes disueltos.

Las ecuaciones propuestas para relacionar la velocidad específica de crecimiento con la intensidad de iluminación, pueden resumirse en:

- *Modelo discontinuo*

$$\mu = \alpha I_0 \quad I_0 \leq I_s \quad [2.22]$$

$$\mu = \mu_m \quad I_0 \geq I_s \quad [2.23]$$

que implica una variación lineal de  $\mu$  con  $I_0$  hasta  $I_0 = I_s$  y una constancia de  $\mu$  a valores de  $I_0 > I_s$ .

- *Modelo hiperbólico* de Tamiya y cols. (1953) análogo en su formulación al modelo de Monod

$$\mu = \frac{\alpha \mu_m I_0}{\mu_m + \alpha I_0} \quad [2.24]$$

- *Modelo exponencial*

$$\mu = \mu_m (1 - e^{-I/I_s}) \quad [2.25]$$

Los resultados obtenidos por Oorschot (1955) para el crecimiento autotrófico de *Chlorella* y *Scenedesmus* al aplicar este modelo ponen de manifiesto que simplifican mucho la realidad y según el autor citado los resultados experimentales se encuentran en un intermedio entre el modelo discontinuo y el exponencial.

Otros investigadores encuentran que intensidades luminosas muy altas inhiben el crecimiento celular, sobre todo a bajas temperaturas, por ello se han propuesto también ecuaciones para relacionar  $\mu$  con  $I_0$  que tienen en cuenta este hecho, Steele (1977).

$$\mu = \frac{\mu_m I}{I_m} e^{(1-I/I_m)} \quad [2.26]$$

Los resultados obtenidos por Myers (1946, 1953) en cultivo continuo de *Chlorella vulgaris*, así como los obtenidos sobre *Chlorella pyrenoidosa* creciendo autotroficamente, Martínez (1980), se ajustan mejor a la ecuación exponencial.

## 2.7 RENDIMIENTOS

Una variable importante para evaluar económicamente el potencial de una fuente de carbono en su transformación a biomasa o producto, es el término macroscópico de rendimiento. Se encuentra, en la bibliografía, diversas formas de expresar el rendimiento como una medida de la eficacia del crecimiento de los microorganismos.

-  $Y$  o  $Y_S$ , rendimiento de biomasa, en base molar o másica.

Mide la conversión del sustrato a biomasa expresado en g biomasa producida/ mol sustrato consumido o g biomasa producida/ g de sustrato consumido. Si el nutriente limitante a estudiar es la fuente de carbono se usa, con frecuencia, el término de rendimiento de carbono,  $Y_C$ , en vez de  $Y$  o  $Y_S$ .

-  $Y_{KJ}$  o  $Y_{Kcal}$ , rendimiento energético, g biomasa producida por KJ o Kcal contenidas en el sustrato consumido por encima de un estado de referencia.

-  $\eta_E$ , rendimiento bioenergético, representa la fracción de energía procedente de la fuente de energía utilizada en el cultivo que se ha incorporado a la biomasa producida.

### 2.7.1 RENDIMIENTO MASICO O MOLAR

El rendimiento macroscópico de sustrato a biomasa,  $Y_s$  o  $Y$ , es el cociente entre la biomasa producida y el sustrato consumido y depende fundamentalmente del microorganismo utilizado, de las condiciones de crecimiento (pH, T, concentración de oxígeno...) y del tipo de cultivo. Puede permanecer constante cuando no se alteran las condiciones del cultivo, sin embargo, depende del sustrato.

Este rendimiento presenta un intervalo de variación muy amplio incluso para un mismo sustrato orgánico. Para azúcares y alcoholes el intervalo de  $Y_s$  expresado como g biomasa/g sustrato es de 0.18 - 0.65 y 0.19 - 0.70 respectivamente, Quintero (1981).

### 2.7.2 RENDIMIENTO ENERGETICO

El concepto de rendimiento energético  $Y_{KJ}$  o  $Y_{Kcal}$ , ha sido muy estudiado en los últimos años y se ha ido modificando en cuanto a su concepción primitiva.

Ogawa y col. (1981) calculan un rendimiento energético  $Y_{KJ}$  para el crecimiento mixotrófico en continuo del alga *Chlorella pyrenoidosa* mediante la expresión:

$$Y_{KJ} = \frac{D V X}{I_a A + (-\Delta H_s) D V (S_0 - S)} \quad [2.27]$$

Siendo:

$Y_{KJ}$ , rendimiento energético (g biomasa/KJ)  
 $D$ , velocidad de dilución ( $h^{-1}$ )  
 $X$ , concentración de biomasa del alga en el estado estacionario (g/L).  
 $V$ , volumen del cultivo (L).  
 $I_a$ , energía luminosa absorbida por el alga ( $KJ/cm^2 \cdot h$ )  
 $A$ , área expuesta a la radiación luminosa ( $cm^2$ )  
 $(-\Delta H_s)$ , calor de combustión de la glucosa (KJ/g)  
 $S_0$ , concentración de glucosa del alimento (g/L).  
 $S$  concentración de glucosa (g/L), del estado estacionario.

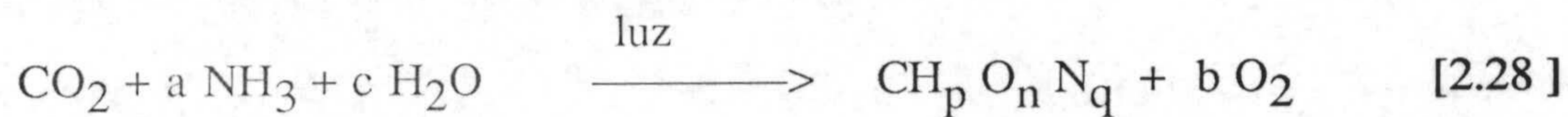
Estos autores obtienen un  $Y_{KJ}$  que varía entre 0.018 y 0.024 g biomasa/KJ según la velocidad de dilución.

### 2.7.3 RENDIMIENTO BIOENERGETICO

H.Y. Lee y cols (1984,1985) proponen un método para el cálculo del rendimiento bioenergético  $\eta_E$ . Este método puede particularizarse para los diversos tipos de crecimiento:

#### 2.7.3.1 Crecimiento autotrófico.

Lee y cols (1984) y Lee y cols (1993) proponen la siguiente ecuación para representar el crecimiento autotrófico:



donde  $NH_3$  representa la fuente de nitrógeno del medio y  $CH_p O_n N_q$  la composición de la biomasa.

En este crecimiento se puede plantear el balance de carbono mediante la expresión



$$Q_{CO_2} X = \frac{D X \sigma_b}{12} \quad [2.29]$$

siendo

$Q_{CO_2}$  velocidad de consumo de  $CO_2$  (mol-g  $CO_2$ )/g células h)

X concentración de biomasa (g/l)

D velocidad de dilución ( $h^{-1}$ )

$\sigma_b$  fracción másica de carbono en la biomasa, (g C en la biomasa/ g biomasa)

También se puede plantear un balance de energía en la forma siguiente

ENERGIA TOTAL = ENERGIA INCORPORADA + ENERGIA PERDIDA POR RADIACION  
 APORTADA A LA BIOMASA CONDUCCION Y CONVENCION

$$I_a A = \frac{F X \sigma_b \gamma_b Q_o}{12} + Q_h$$

Dividiendo por la energía total aportada  $I_a A$  el balance queda:

$$\frac{F X \sigma_b \gamma_b Q_o}{12 I_a A} + \frac{Q_h}{I_a A} = 1 \quad [2.30]$$

en el que el segundo término representa la fracción de energía pérdida como calor y el primer término es el rendimiento bionergético.

$$\eta_E = \frac{F X \sigma_b \gamma_b Q_o}{12 I_a A} \quad [2.31]$$

y donde :

F es la velocidad de flujo volumétrico (L/h)

$\gamma_b$ , el grado de reducción de la biomasa, (equiv. de e- disponibles/atomo-gramo de C en la biomasa)

$Q_o$ , energía de la biomasa por equivalente de electrones disponibles.

Hasta aquí hemos hablado de cultivo autotrófico continuo, en el crecimiento discontinuo se puede estimar también este rendimiento bioenergético.

Cuando el proceso de crecimiento está limitado energéticamente se observa una región de crecimiento lineal, en donde la masa celular crece linealmente con el tiempo. Si la velocidad de crecimiento ( $dX/dt$ ) es constante, la pendiente puede ser usada para estimar el rendimiento según la ecuación:

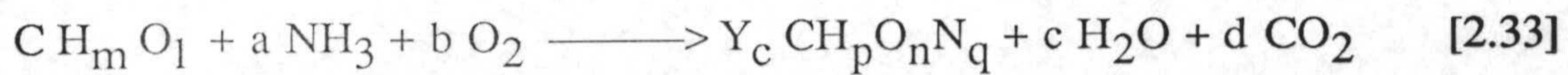
$$\eta_E = \frac{(dX/dt) V \sigma_b \gamma_b Q_o}{12 \text{ Ia A}} \quad [ 2.32 ]$$

En crecimiento autotrófico Lee y cols (1984) aplican estos cálculos para obtener rendimientos bioenergéticos a partir de los datos publicados por otros autores. Así de los datos de Aiba y Ogawa para *Spirulina platensis* obtienen un  $\eta_E$  que varia desde 0.0721 hasta 0.108 dependiendo de la velocidad de dilución y de la intensidad de iluminación. De los datos de Myers para *Chlorella pyrenoidosa* obtienen un  $\eta_E$  en el intervalo de 0.1277 -0.1621.

En cultivo discontinuo obtienen rendimientos en el intervalo de 0.1522 hasta 0.0702 dependiendo de la intensidad de iluminación y de si hay agitación o no, a partir de los datos aportados por Winokur para *Chlorella pyrenoidosa*.

### 2.7.3.2 Crecimiento fotoheterotrófico y mixotrófico.

Para representar estos dos tipos de crecimiento H.Y. Lee y cols.(1985) proponen la siguiente ecuación.



siendo  $CH_m O_l$ , la fórmula elemental del sustrato orgánico,  $CH_p O_n N_q$  de la biomasa y  $Y_c$  es el rendimiento en carbono de la biomasa.

A partir de la expresión anterior se puede plantear el balance de carbono de la forma siguiente:

$$1 = Y_c + d \quad [2.34]$$

El coeficiente d puede ser negativo, positivo o cero. Si d es negativo el  $CO_2$  es usado como fuente de carbono para el crecimiento.

El coeficiente b también puede ser negativo, positivo o cero para las algas. Si b es negativo significa que se está realizando la fotosíntesis y produciendo  $O_2$ .

El balance de energía estos autores lo plantean en los términos siguientes:

ENERGIA DEL SUSTRATO	ENERGIA LUMINOSA	ENERGIA EN LA BIOMASA	ENERGIA DESPRENDIDA POR CALOR.
$Q_s \gamma_s$	+	$Q_r$	=
		$Q_b \gamma_b Y_c$	+
			$Q_h$

siendo  $Q_s$ , energía contenida en el sustrato por equiv. de  $e^-$  disponibles

$\gamma_s$ , grado de reducción del sustrato, equiv. de  $e^-$  disponibles/átomo g de C

$Q_b$ , energía en la biomasa por equivalente de  $e^-$  disponibles, KJ/equiv de  $e^-$  disponibles.

$Q_r$ , energía radiante suministrada por átomo-gramo de C de sustrato consumido, KJ/átomo-gramo de C

$Q_h$ , calor desprendido por átomo-gramo de carbono de sustrato consumido.

Si se divide la ecuación por el primer término se obtiene:

$$\frac{Q_b \gamma_b Y_c}{Q_S \gamma_S + Q_r} + \frac{Q_h}{Q_S \gamma_S + Q_r} = 1 \quad [2.35]$$

El primer término representa la fracción de energía incorporada a la biomasa, es decir, el rendimiento bionérgico  $\eta_E$ .

$$\eta_E = \frac{Q_b \gamma_b Y_c}{Q_S \gamma_S + Q_r} \quad [2.36]$$

$Q_b$  es la denominada "regularidad energética" que vale aproximadamente 113 KJ / equiv.  $e^-$  disponibles o 27 Kcal/ equiv.  $e^-$  disponible,. Para  $Q_S$  se encuentra también frecuentemente valores de 113 KJ/equiv. de  $e^-$  disponibles.

H.Y. Lee y cols(1985) al igual que en crecimiento autotrófico, aplican estos cálculos, para obtener el rendimiento bionérgico a datos publicados en la bibliografía por otros autores.

Así para los datos de Ogawa sobre *Chlorella vulgaris*, ya comentados en el rendimiento energético  $Y_{KJ}$ , obtienen un  $\eta_E$  que varía entre 0.359 y 0.490 en función de la velocidad de dilución.

Los valores de  $\eta_E$  varían entre 0.418 y 0.739, para diversas especies de *Chlorella* en condiciones mixotróficas, creciendo en un medio con glucosa y calculados a partir de los datos aportados por Markl (1980).

## 2.7 OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

La experiencia previa del Departamento de Ingeniería Química en el cultivo de microalgas de agua dulce y marinas, así como la revisión bibliográfica realizada sobre este tema, ha puesto de manifiesto el gran interés del estudio del **Crecimiento Mixotrófico** de microalgas con una triple finalidad.

- Aumentar la productividad de biomasa en los estanques de cultivo mediante la adición de un sustrato orgánico que facilite el crecimiento en zonas de baja intensidad de iluminación.

- Aumentar la velocidad de eliminación de sustancias orgánicas en el tratamiento de aguas residuales mediante los sistemas algas-bacterias.

- Favorecer y dirigir el metabolismo de microalgas hacia la síntesis de biomoléculas de alto rendimiento económico.

Por estas razones se decidió estudiar experimentalmente el crecimiento mixotrófico de la microalga de agua dulce *Chlorella Pyrenoidosa*, microalgas sobre la que en el Departamento se tenía experiencia en cuanto al estudio de los crecimientos autotrófico Martínez, (1980) y heterotrófico Sánchez, (1986).

Los cultivos se han realizado en una instalación a escala de laboratorio, con tres fotobiorreactores de funcionamiento en discontinuo. El crecimiento se ha evaluado a partir de la determinación experimental, a diferentes tiempos, de las siguientes variables:

- Concentración de biomasa
- Concentración de clorofila en la biomasa
- Concentración de sustrato orgánico en el medio de cultivo.

y se seleccionó el estudio de la influencia sobre el crecimiento mixotrófico de las siguientes variables del cultivo:

- Naturaleza del sustrato orgánico
- Concentración del sustrato orgánico
- Intensidad de iluminación incidente
- Temperatura
- pH

Con este objeto de esclarecer los mecanismos de utilización del sustrato orgánico y de la luz en el crecimiento mixotrófico de *Chlorella Pyrenoidosa*, ha sido preciso estudiar los crecimientos fotoheterotrófico y anaerobio, analizar el efecto de las variables del cultivo sobre estos crecimientos y realizar experimentos en los que el alga ve inhibida su capacidad de realizar la función fotosintética por adición al medio de cultivo del inhibidor DCMU.

### 3. TECNICA EXPERIMENTAL

3.1

### 3.1 DESCRIPCION DE LA INSTALACION.

El estudio cinético del crecimiento se ha llevado a cabo en el laboratorio existente en el Departamento de Ingeniería Química especialmente preparado para el cultivo de algas unicelulares con luz artificial y en condiciones controladas.

La instalación se ha representado esquemáticamente en la Figura 3.1. A continuación se van a describir los elementos que la integran y su funcionamiento.

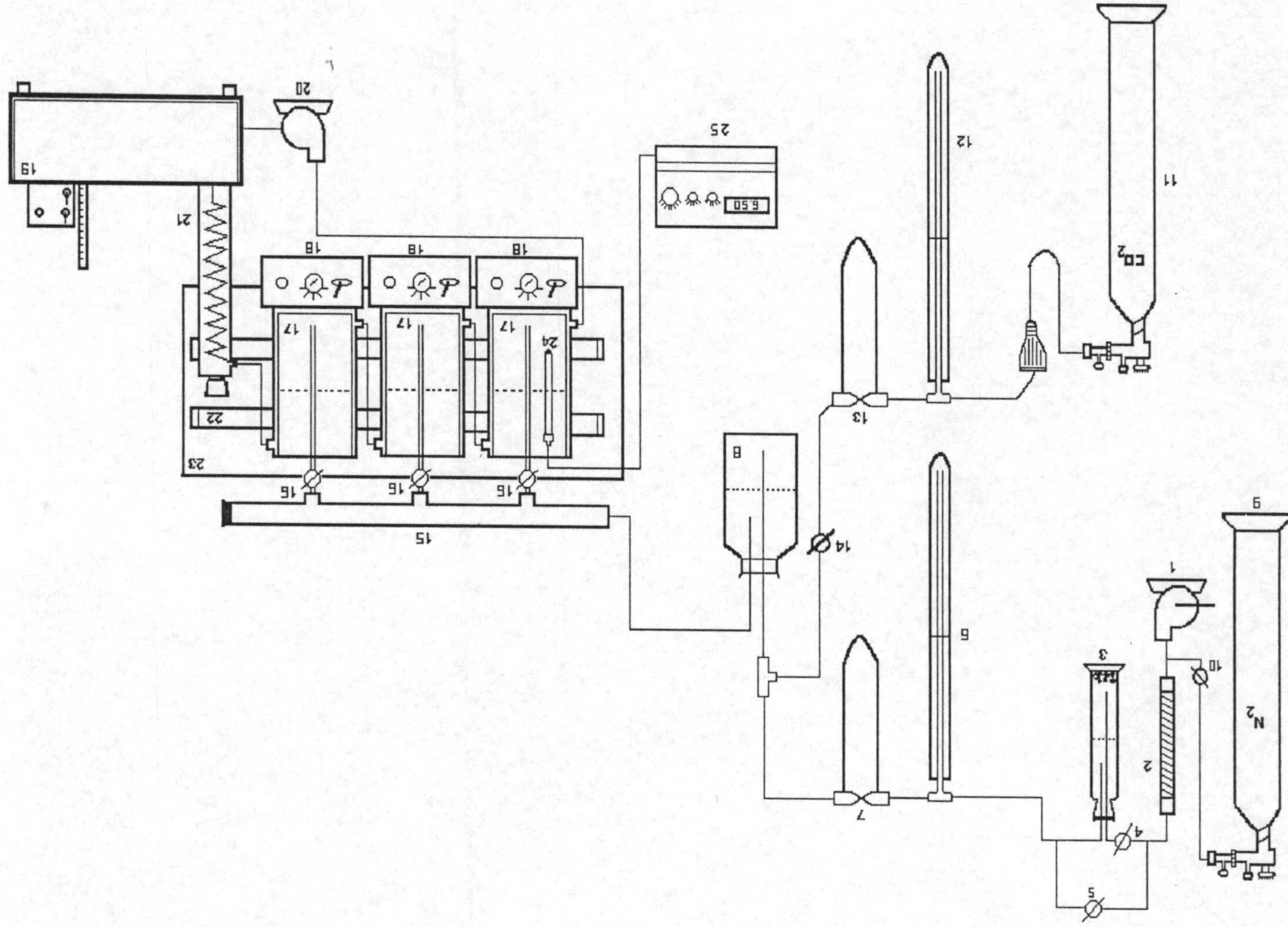
#### 3.1.1 SUMINISTRO DE AIRE

El compresor -1- SIROCCO mod C-1 provisto de regulador de caudal introduce el aire procedente de la habitación en el montaje y a continuación se le eliminan impurezas en suspensión haciéndolo pasar a través de un filtro -2- de algodón hidrófobo. En este punto el aire tiene dos caminos alternativos según sea el tipo de crecimiento en estudio, fotoheterotrófico o mixotrófico. En el primer caso pasa por un frasco lavador -3- que contiene una solución saturada de NaOH para absorber el CO<sub>2</sub> atmosférico, en el segundo caso pasa por la bifurcación mediante el uso de las llaves -4- y -5-. Mediante una unión en T entra en la columna estabilizadora -6- que contiene agua y que permite conocer su presión de salida y la pérdida de carga originada por la instalación.

A continuación se mide el caudal con el diafragma de vidrio -7- y se mezcla con CO<sub>2</sub> para los experimentos de cultivo mixotrófico y se introduce en el depósito -8- donde se humidifica. Esta humidificación se lleva a cabo para evitar en lo posible las pérdidas posteriores de medio de cultivo al burbujear en los vasos de crecimiento.



FIG. 31



### 3.1.2 SUMINISTRO DE NITROGENO

El nitrógeno para atmósfera inerte en los experimentos de crecimiento anaerobio se suministra al sistema mediante la bala -9- pasa a través de la llave -10- cerrada para el resto de los experimentos y entra en el circuito de conducción de aire siguiendo el recorrido descrito anteriormente y sin necesidad de entrar en el absorbedor de CO<sub>2</sub>.

### 3.1.3 SUMINISTRO DE DIOXIDO DE CARBONO

El dióxido de carbono necesario para los experimentos de crecimiento mixotrófico procede de la bala -11- a la que se han conectado dos manorreductores en serie para conseguir un mejor control de los caudales de trabajo. Sigue su recorrido pasando por una columna estabilizadora -12- un medidor de caudal -13- una llave -14- cerrada para el resto de los experimentos y entra en el depósito -8- donde se humidifica y mezcla con el aire.

### 3.1.4 DISTRIBUIDOR DE GASES

Dependiendo del tipo de crecimiento en estudio al distribuidor -15- llegan los siguientes gases o mezclas gaseosas.

Crecimiento ANAEROBIO.....	.....	500 ml/l min NITROGENO
Crecimiento FOTOHETEROTROFICO.....	.....	500 ml/l min AIRE exento CO <sub>2</sub>
Crecimiento MIXOTROFICO.....	....	500 ml/l min AIRE-CO <sub>2</sub> al 5% v/v

Estos caudales y composiciones, por vaso de cultivo aseguran que no exista limitación del crecimiento por el oxígeno o por el CO<sub>2</sub> según los casos y que las condiciones de agitación originadas por el burbujeo, sean las mismas en todos los experimentos.

Para repartir el caudal gaseoso total entre los vasos de cultivo, se regula la pérdida de carga de las tres ramas del distribuidor mediante las llaves -16-.

### 3.1.5 VASOS DE CULTIVO

El crecimiento ha tenido lugar en tres vasos de cultivo cilíndricos -17- provistos de camisa para la circulación del agua de termostatación.

Las dimensiones útiles de estos vasos son:

DIAMETRO INTERNO	ALTURA
7.5 cm	24 cm

En todos los experimentos, se ha trabajado con un volumen de 500 ml de medio de cultivo por vaso.

### 3.1.6 AGITACION

La agitación necesaria para mantener las suspensiones en crecimiento, perfectamente homogéneas se consiguió sumando a la agitación provocada por el burbujeo gaseoso la suministrada por la acción de tres agitadores magnéticos -18- SELECTA mod Agimatic situados en las bases de los vasos de cultivo.

Para todos los experimentos se ha utilizado una velocidad de agitación constante y que asegura la mezcla perfecta en la suspensión.

### 3.1.7 CIRCUITO DE TERMOSTATACION

Se ha utilizado agua, como fluido termostático, que se acondiciona en el baño -19- HETO mod. 015623 y circula mediante la bomba centrífuga -20- por las camisas de los vasos de cultivo que están conectados en serie, retornando al baño -19- .

A fin de conseguir una mayor estabilización de la temperatura de trabajo, el agua de retorno es enfriada haciéndola pasar a través de un refrigerante -21- antes de introducirse en el baño.

La temperatura seleccionada para la realización de la mayor parte de los experimentos ha sido de 30°C ,temperatura óptima para el crecimiento de microalgas, Shamala y col (1982) ,salvo las específicas de estudio de la influencia de la temperatura sobre el crecimiento, que han sido 25, 27.5, 32.5 y 35°C.

### 3.1.8 ILUMINACION

La iluminación la proporcionan dos lámparas fluorescentes -22- WESTHINGHOUSE PLANT-GRO mod F40/GRO, especiales para crecimiento por emitir la mayor parte de su luz a longitudes de onda correspondientes a las zonas roja y azul del espectro.

En la Figura 3.2 se ha representado un esquema de la distribución espectral de la luz suministrada por estas lámparas

Estas lámparas -22-, van instaladas en un panel móvil -23- lo que permite acercarlas o alejarlas de los vasos de cultivo -17- según la intensidad de iluminación requerida.

Para conseguir intensidades de iluminación bajas se han utilizado unos paneles de tela metálica de distinta luz de malla enmarcados en madera y pintado el conjunto de negro mate. La interposición de estos paneles bien de uno en uno o formando combinaciones, ha permitido obtener las intensidades más bajas que se seleccionaron para los experimentos.

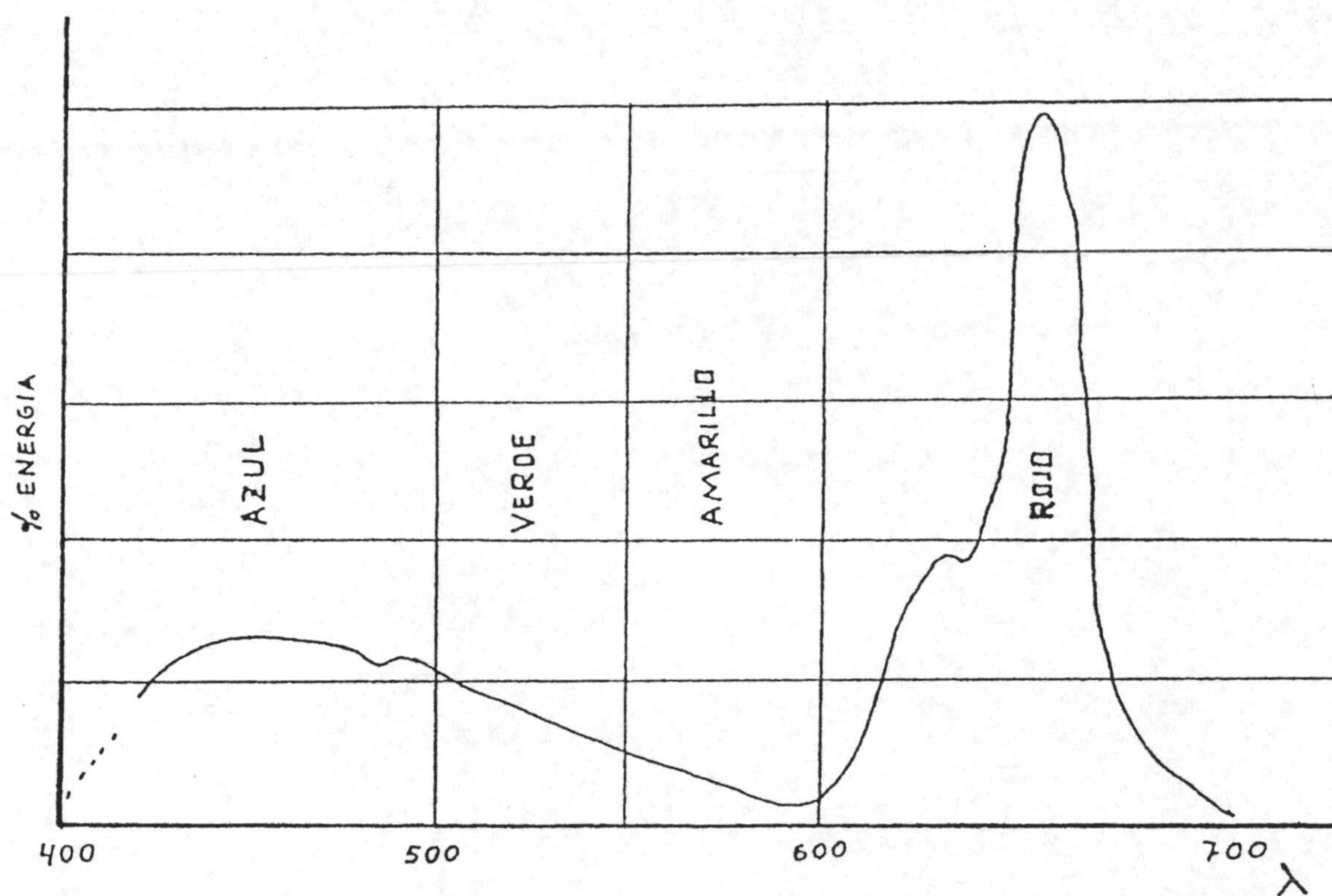


FIG 3.2

## 3.2 PROCEDIMIENTO

### 3.2.1 MICROALGA UTILIZADA.

El microorganismo utilizado ha sido el alga unicelular *Chlorella pyrenoidosa*, Chick 8H Emerson procedente de la colección de la Escuela Botánica de Cambridge que nos fue suministrada por el Instituto Jaime Ferrán del C.S.I.C.

### 3.2.2 CONSERVACION DE LOS CULTIVOS DE ALGAS

El almacenamiento de las algas tiene lugar en medio sólido. Este se prepara en tubos de ensayo de 100 ml de capacidad llenos con 20 ml de una disolución que contiene medio de cultivo mineral y bacto-agar DIFCO al 2% en peso, obtenida calentando hasta comienzos de ebullición.

Los tubos se tapan con algodón hidrófobo y se esterilizan en un autoclave TD mod.alto durante 30 minutos a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup>. Una vez esterilizados se deja solidificar el medio por enfriamiento hasta temperatura ambiente situando los tubos en posición inclinada para aumentar la superficie libre del sólido.

Antes de esterilizar, el pH del medio de cultivo se ajusta a 7 para evitar una posible pérdida del poder gelificante del agar en medio ácido.

Los tubos de medio sólido así preparados se dejan secar durante 48 horas a temperatura ambiente y a continuación se inoculan en condiciones estériles flameando la boca de los tubos y desplazando el asa de platino en zig-zag sobre la superficie de inoculación. Estos tubos se mantienen en el laboratorio a temperatura e iluminación ambiental y se renuevan periódicamente para mantener la viabilidad de los organismos.

### 3.2.3 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio mineral de cultivo utilizado ha sido el medio A propuesto por Rodriguez (1964). La composición del mismo se indica en la Tabla 3.1

El medio se constituye a partir de unas disoluciones madres permanentemente preparadas y conservadas a baja temperatura salvo la denominada disolución D ya que precipita en frío. Los componentes y concentraciones de estas disoluciones madres se indican en la Tabla 3.2.

Un litro de medio mineral se preparaba de acuerdo con el siguiente esquema:

Solución A .....	100 ml
Solución B .....	10 ml
Solución C .....	10 ml
Solución D .....	1 ml
Solución E .....	1 ml
Solución F .....	1 ml
Agua destilada hasta	1000 ml.

A este medio mineral así preparado se le añade el volumen necesario de disolución concentrada del sustrato orgánico para que mediante la dilución en los 500 ml. de medio proporcione la concentración deseada para cada experimento

Como sustratos orgánicos se han utilizado glucosa a concentraciones de 0.1; 0.5; 1; 4; 6 y 10 g/l, ácido acético a 0.25; 0.50; 0.75; 1; 3; 5; y 10 mM, etanol y acetaldéhidó a 1mM.

El pH seleccionado para cada experimento se medía y controlaba mediante el electrodo -24- Figura 3.1 conectado al pH-metro digital -25- CRISON DIGIT.501, este valor se mantenía constante en el transcurso del experimento por adición de disolución ácida o básica según los casos. Se ha trabajado a valores de 3; 4; 5; 6.5; 7; 7.5; 8 y 8.5.

TABLA 3.1

MACRONUTRIENTES	CONCENTRACION g/L
KNO <sub>3</sub> .....	1.011
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O .....	1.631
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0.078
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.247
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0.015
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.007 (complejado con EDTA)

MICRONUTRIENTES	CONCENTRACION p.p.m.
Mn .....	0.06
Zn .....	0.07
Cu .....	0.06
B .....	0.01
Mo .....	0.001



TABLA 3.2

SOLUCION	NUTRIENTE	CONCENTRACION, g/L
A	KNO <sub>3</sub>	10.111
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	16.310
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.780
B	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	24.650
C	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.470
D	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7.000
	EDTA	9.300
E	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.170
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.290
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.250
F	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.061
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.013

#### 3.2.4 PRECULTIVO

Con objeto de obtener biomasa que constituya el inóculo en los experimentos de crecimiento es preciso realizar un precultivo. Este se realiza inoculando 10 tubos de medio sólido y manteniéndolos en la zona de precultivo a temperatura ambiente e iluminación continua con las lámparas ya descritas, durante 96 horas.

#### 3.2.5 PREPARACION DEL INOCULO LIQUIDO

El inóculo líquido del que se parte para cada experimento está formado por una suspensión de las células del precultivo.

Transcurridas las 96 horas señaladas, se suspenden las células en condiciones estériles mediante la adición de medio mineral a los tubos del precultivo. La suspensión se consigue agitando suavemente a fin de no arrastrar partículas de agar y se concentra pasándola sucesivamente por los 10 tubos inoculados.

A continuación se determina la concentración de esta suspensión y se calcula el volumen necesario para adicionar a los vasos de cultivo de forma que en todos los experimentos se parta aproximadamente de una concentración celular de 0.008 g/L expresada en gramos de biomasa seca por litro de suspensión.

#### 3.2.6 INOCULACION DE LOS VASOS DE CRECIMIENTO

Antes de proceder a la inoculación, se ajusta la temperatura e intensidad de iluminación incidente seleccionadas para el experimento. A continuación se vierte en cada vaso mediante una pipeta el volumen de inóculo calculado previamente y se ajusta composición y caudal de la mezcla gaseosa. Finalmente se conectan los

agitadores magnéticos , y se toma la primera muestra de suspensión a fin de comprobar la concentración calculada inicialmente.

Los experimentos han tenido duración variable desde 7 a 74.50 horas y la frecuencia de toma de muestra de 1 a 14 horas.

### 3.3 MEDIDA DE CAUDALES

Para la medida de los caudales de aire, nitrógeno y dióxido de carbono se utilizaron diafragmas de vidrio conectados a manómetros diferenciales multiplicadores de dos líquidos agua y alcohol amílico coloreado con yodo.

Los diafragmas se calibraron midiendo las diferencias de altura manométrica,  $\Delta h$ , que originaban el paso de caudales conocidos de aire, nitrógeno y dióxido de carbono mediante un medidor de burbuja conectado en serie con la instalación.

Los resultados de este calibrado se recogen en la Tabla 3.3 donde también se indican los coeficientes de regresión obtenidos en el ajuste de  $\log Q$  frente a  $\log \Delta h$  y se han representado en las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5.

TABLA 3.3

AIRE		NITROGENO		DIOXIDO DE CARBONO	
$\Delta h, mm$	$Q, ml/min$	$\Delta h, mm$	$Q, ml/min$	$\Delta h, mm$	$Q, ml/min$
14	299	14	315	11	22
20	410	20	432	21	40
25	481	25	506	29	56
31	581	31	612	39	62
37	633	37	666	46	79
43	714	43	752	57	85
49	794	49	836	97	132
55	847	55	892	126	156
61	926	61	975	-	-
67	962	67	1013	-	-
73	1020	73	1074	-	-
79	1064	79	1120	-	-
85	1136	85	1196	-	-
91	1163	91	1224	-	-
93	1190	93	1253	-	-
97	1219	97	1283	-	-
105	1266	105	1333	-	-

$r^2 = 0.996$

$r^2 = 0.996$

$r^2 = 0.992$

MEDIDOR DE AIRE

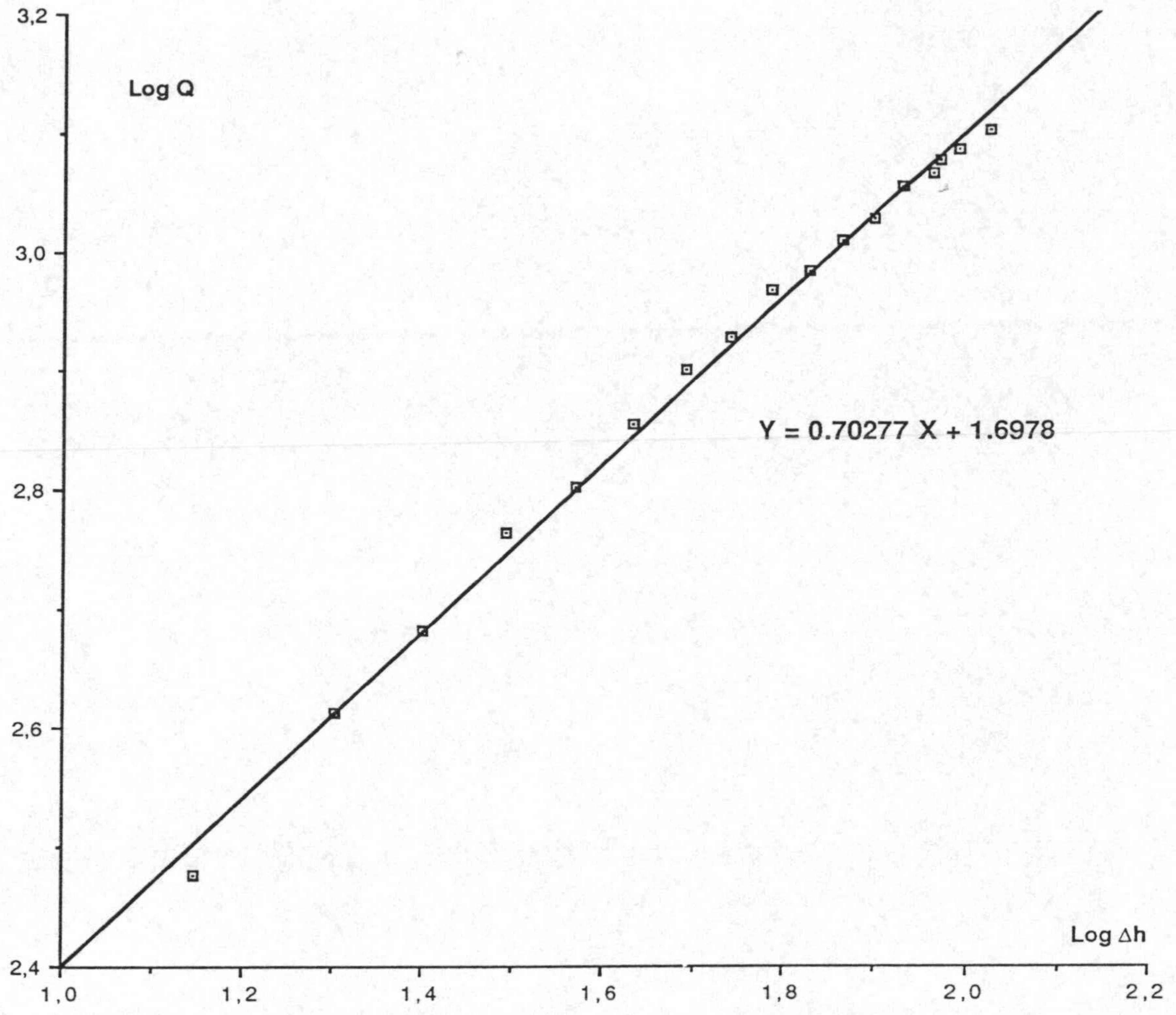


Fig 3.3

# MEDIDOR DE NITROGENO

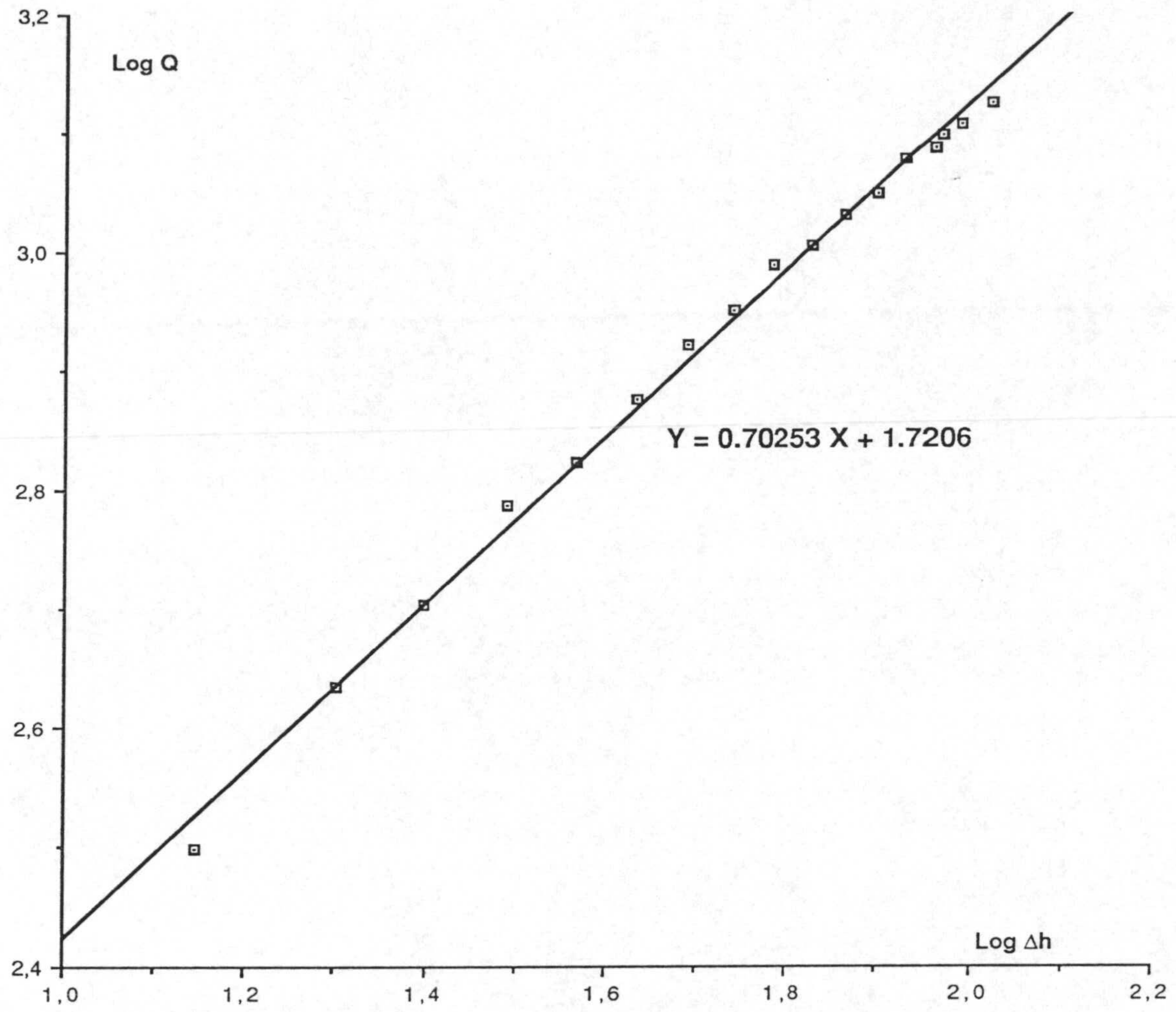


Fig 3.4

# MEDIDOR DE DIOXIDO DE CARBONO

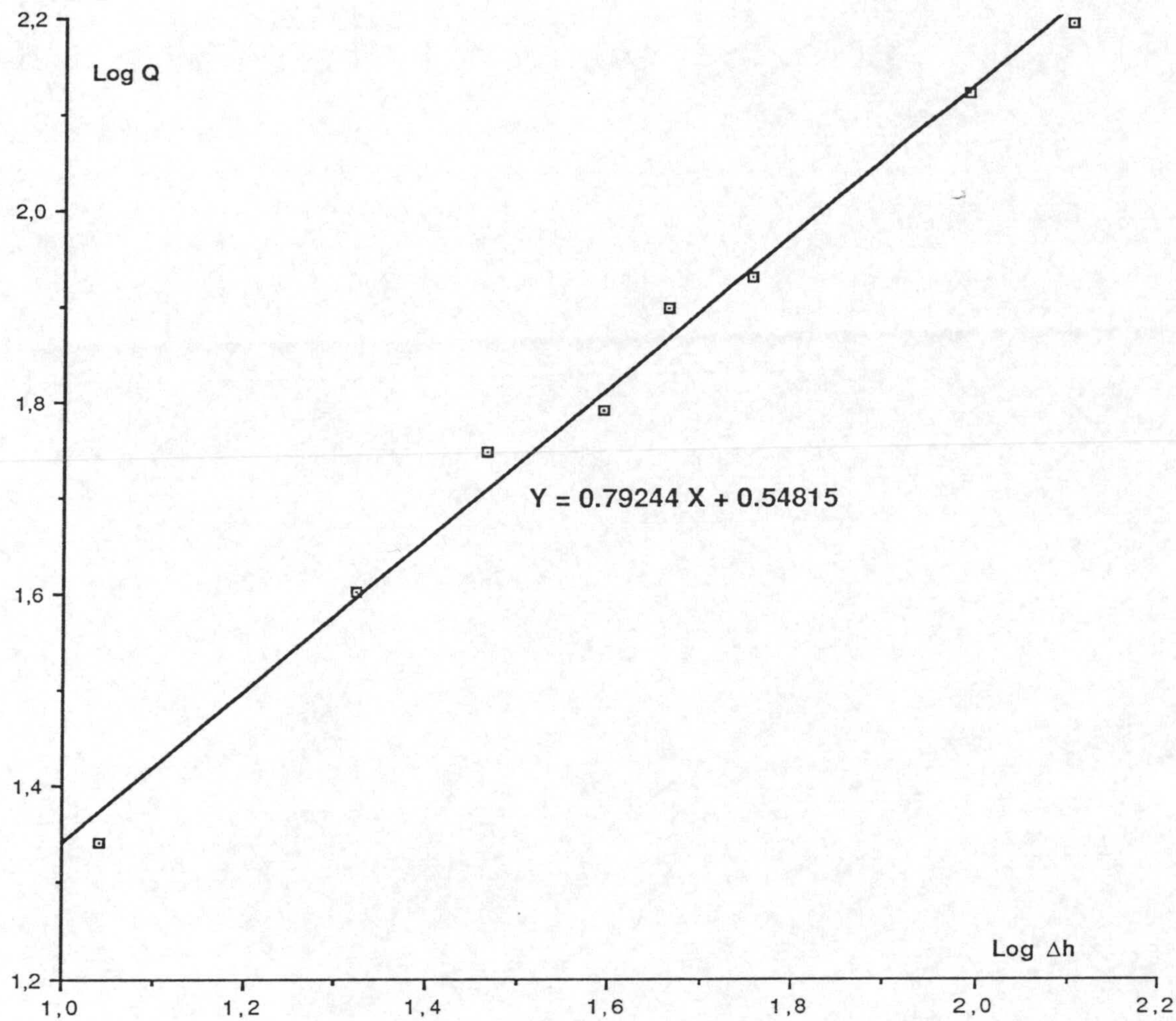


Fig 3.5



## 3.4 DETERMINACION DE LA INTENSIDAD INICIAL DE ILUMINACION

### 3.4.1 MEDIDOR

Para la medida de la intensidad de iluminación se han utilizado nueve fotocélulas L.D.R. insertadas en un bastidor de lucita, que permitía situar éstas a distintas alturas sobre el fondo del vaso de crecimiento, aunque siempre sumergidas totalmente en el medio de cultivo. Un esquema del bastidor se indica en la Figura 3.6 y la disposición geométrica de cada una de las células dentro de la sección del vaso, en la Figura 3.7.

La división del bastidor en tres piezas móviles que podían utilizarse independientemente, evitaba que las fotocélulas anteriores hicieran sombra sobre las posteriores en el momento de la medida.

### 3.4.2 CALIBRADO FOTOCÉLULAS

Cada una de las fotocélulas se calibró previamente contrastándola frente a un luxómetro I.C.E. que permitía medir la intensidad de iluminación directamente, en lux y de esta forma hacerla corresponder con la resistencia de la fotocélula, leída en un multímetro digital Simpson. Este calibrado se realizó utilizando las mismas lámparas fluorescentes ya descritas, a diez distancias al foco luminoso distintas, para cada una de las nueve fotocélulas. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 3.4 y se han representado en las Figuras 3.8, 3.9 y 3.10. En cada una de estas figuras aparecen las rectas de calibrado en coordenadas logarítmicas de tres células, elegidas de forma que no se superpongan los valores experimentales. Las diferencias existentes entre estas 9 rectas, fundamentalmente en el valor de las ordenadas en el origen, justifican la necesidad de este calibrado previo.

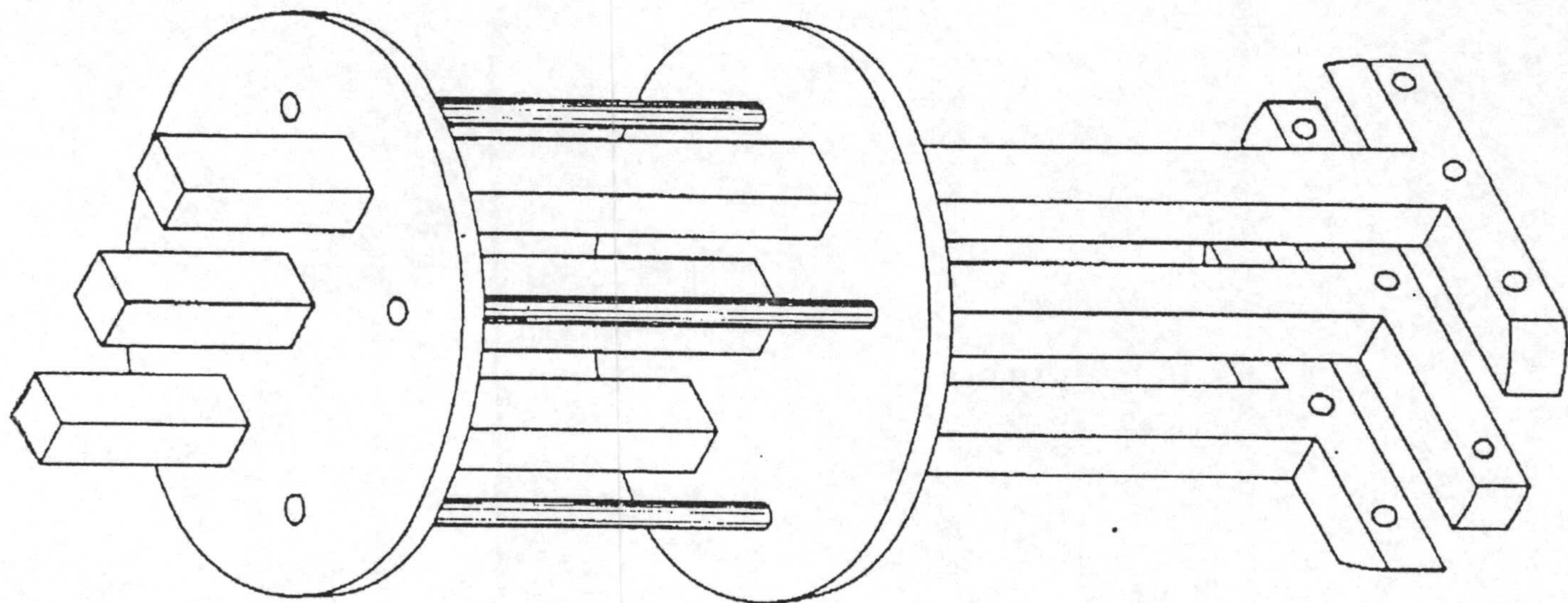
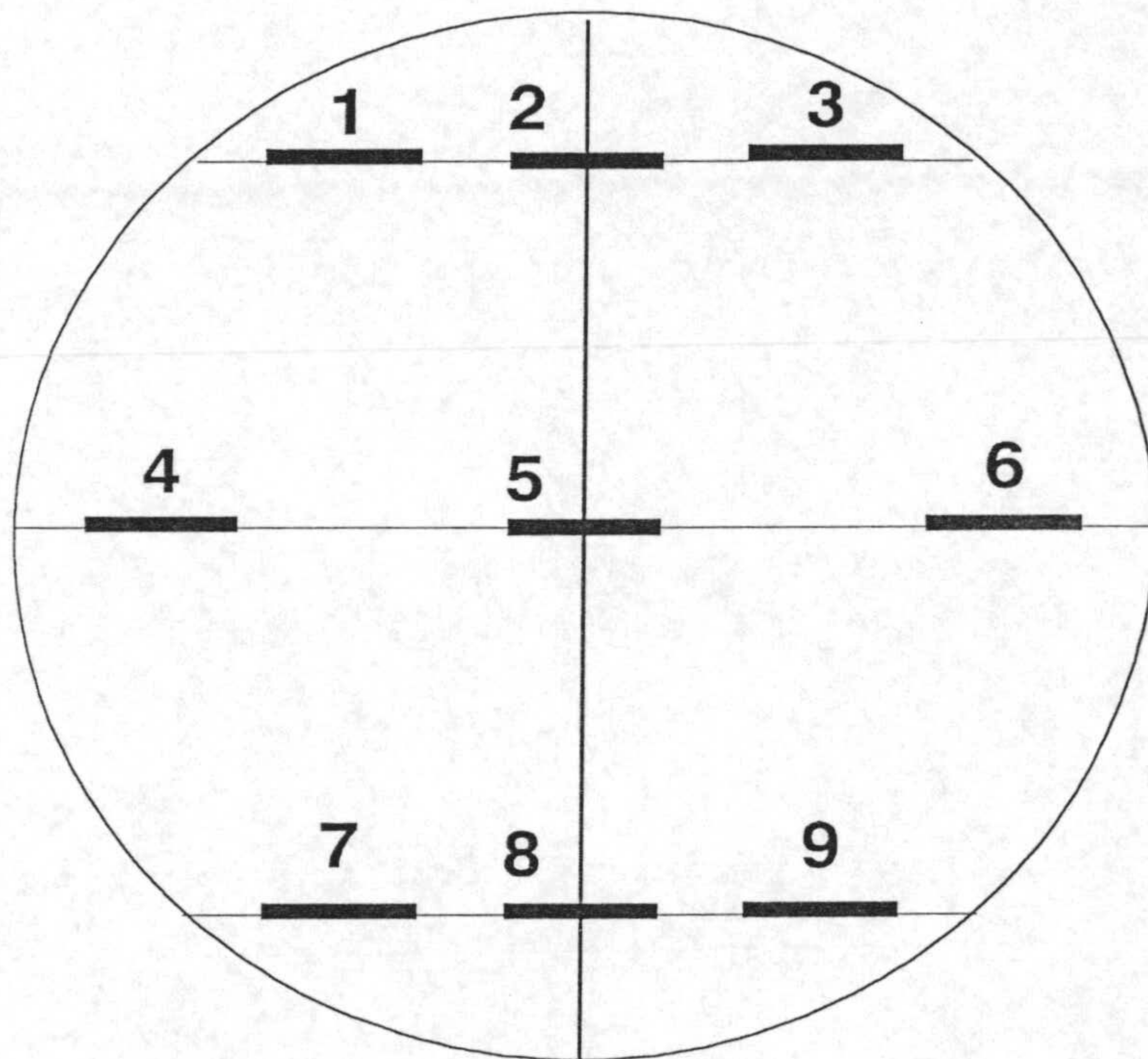
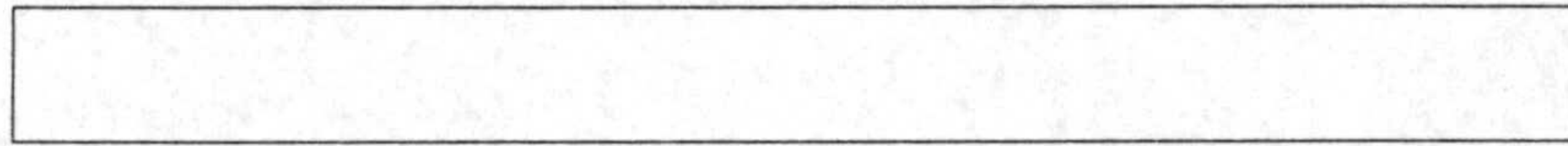


Fig 3.6

FUENTE DE ILUMINACION



VASO DE CULTIVO

FIG. 3.7

TABLA 3.4  
CALIBRADO DE FOTOCELULAS

Distancia	Luxómetro		Resistencias fotocélulas								
	$\Omega$	lux	$\Omega_1$	$\Omega_2$	$\Omega_3$	$\Omega_4$	$\Omega_5$	$\Omega_6$	$\Omega_7$	$\Omega_8$	$\Omega_9$
1	495	1700	110	129	141	139	137	103	281	224	410
2	866	850	264	317	351	335	325	248	705	660	1070
3	1300	510	463	569	623	592	372	440	1230	1194	1920
4	1660	360	722	869	967	894	874	672	2050	1890	2610
5	1950	300	909	1130	1205	1137	1119	864	2610	2670	3210
6	3110	170	1565	2020	2220	1972	1952	1480	4600	4720	5480
7	4080	125	2160	2720	2960	2780	2780	2170	6320	6540	7530
8	5820	80	3180	3970	4360	4090	4080	3250	9380	9840	11010
9	8130	55	4760	6010	6740	6030	5940	4850	14040	15020	16010
10	11760	38	7160	8950	10020	9120	9100	7340	21700	23500	27100

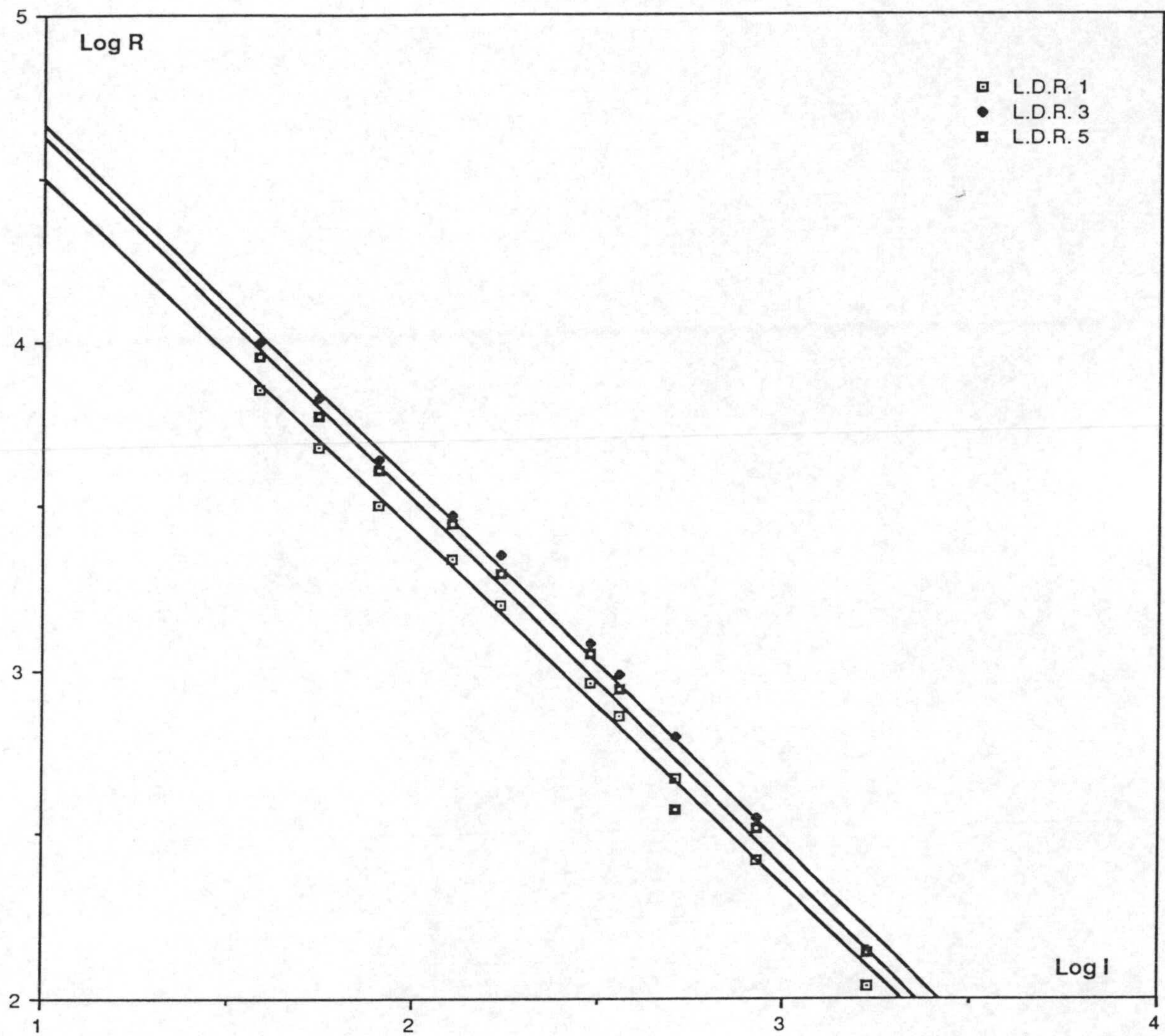


Fig 3.8

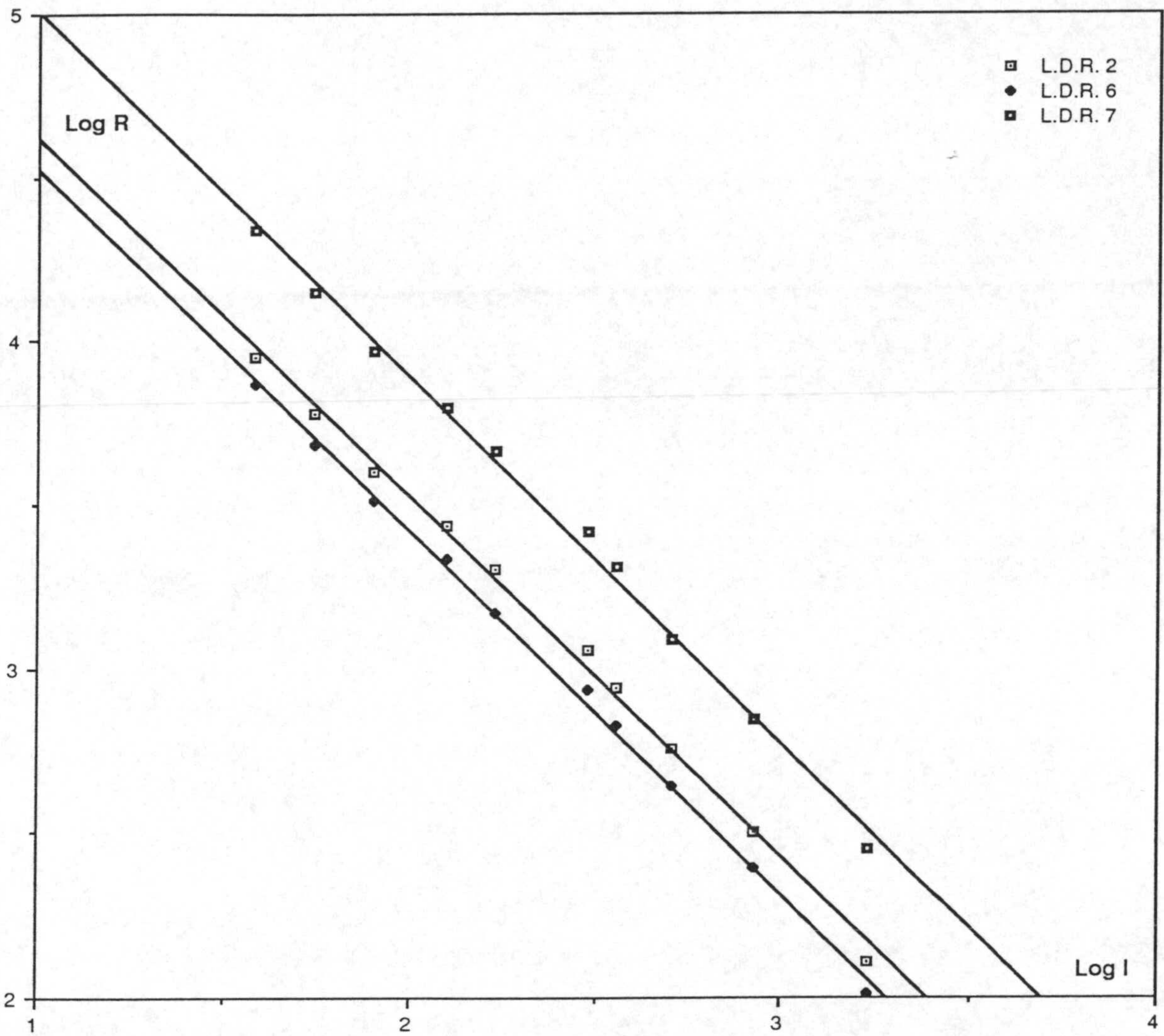


Fig. 3.9

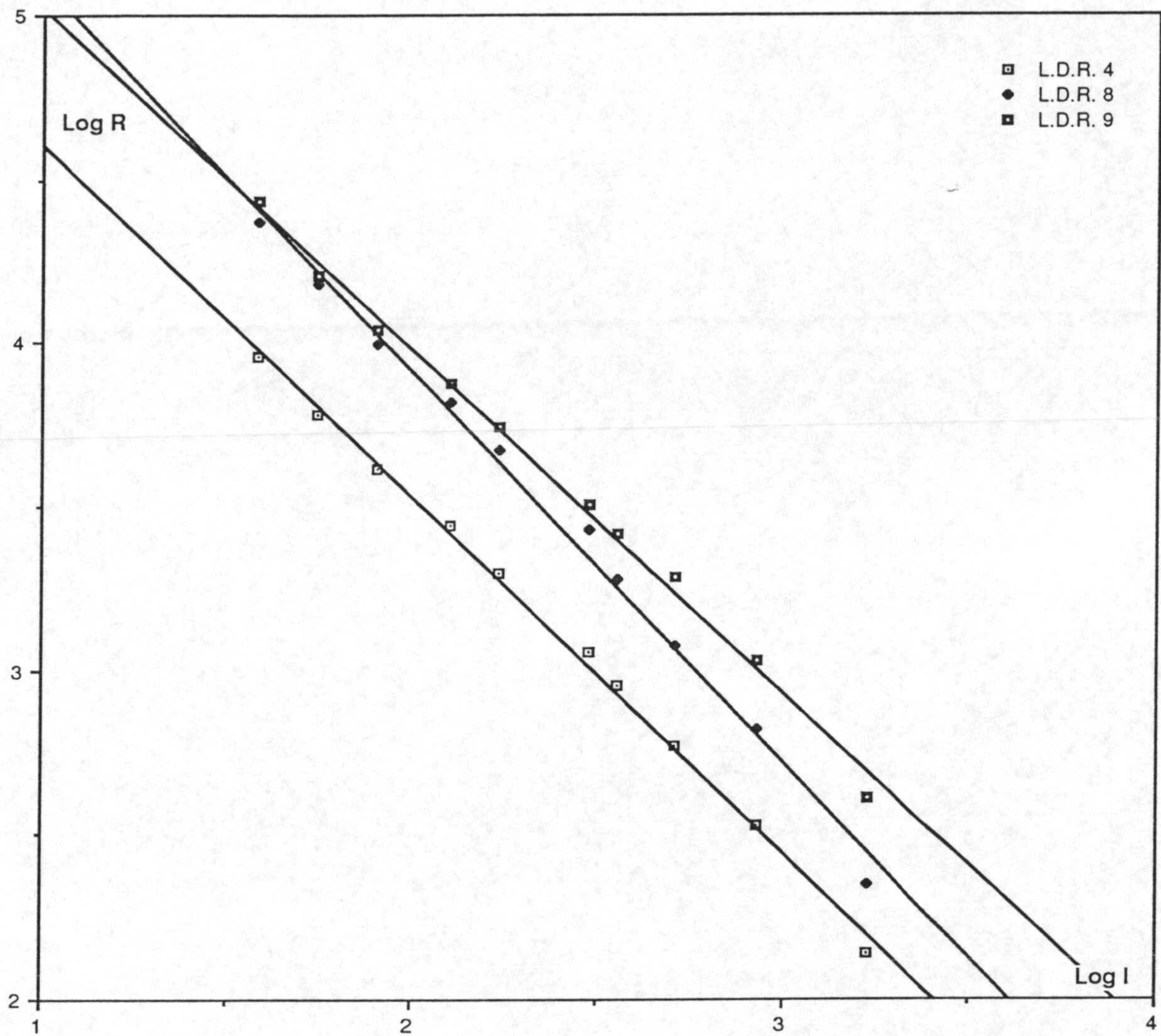


Fig. 3.10

Las líneas anteriores se han ajustado por regresión lineal. Las ecuaciones obtenidas así como los valores del coeficiente de regresión se indican en la Tabla 3.5. Estas ecuaciones se han utilizado para determinar los valores de las intensidades puntuales de iluminación.

TABLA 3.5

<u>Fotocélula</u>	<u>Ecuación</u>	<u>r<sup>2</sup></u>
1	$\text{Log } I = 5.17 - 0.93 \text{ Log } \Omega$	0.998
2	$\text{Log } I = 5.24 - 0.92 \text{ Log } \Omega$	0.998
3	$\text{Log } I = 5.24 - 0.91 \text{ Log } \Omega$	0.998
4	$\text{Log } I = 5.27 - 0.93 \text{ Log } \Omega$	0.999
5	$\text{Log } I = 5.22 - 0.92 \text{ Log } \Omega$	0.999
6	$\text{Log } I = 5.07 - 0.90 \text{ Log } \Omega$	0.999
7	$\text{Log } I = 5.47 - 0.89 \text{ Log } \Omega$	0.998
8	$\text{Log } I = 5.31 - 0.85 \text{ Log } \Omega$	0.998
9	$\text{Log } I = 5.78 - 0.95 \text{ Log } \Omega$	0.998



### 3.4.3 INTENSIDAD MEDIA POR SECCIONES.

Para el cálculo de la intensidad media de iluminación se ha utilizado el procedimiento descrito por Martinez (1980) que consiste en asignar a cada una de las fotocélulas un área de medida, un esquema de esta distribución se indica en la Figura 3.11 y el valor de cada área en la Tabla 3.6 .

Esta distribución de áreas es función de la significación de la medida de cada una de las fotocélulas, debido a su distinta visión del foco luminoso , así como de la influencia del sistema óptico formado por el vaso de cultivo con la camisa de agua de termostatación.

Una vez fijadas estas áreas y conocidas las intensidades puntuales de iluminación se calcularon las intensidades medias en las distintas secciones del vaso de cultivo mediante la ecuación :

$$I_h = \frac{\sum (I_i A_i)}{A_t} \quad [3.1]$$

### 3.4.4 INTENSIDAD MEDIA GLOBAL

La intensidad de iluminación global se calculó a partir de la integración a todo el volumen, de las intensidades medias en 5 secciones situadas a 3.85 ; 5.40 ; 7.20; 9.10 y 10.65 cm sobre el fondo del vaso, mediante la expresión:

$$I_m = \frac{I_1 4.63 + I_2 1.67 + I_3 1.85 + I_4 1.73 + I_5 1.42}{11.3} \quad [3.2]$$

donde los valores numéricos del numerador representan la altura asignada a cada sección y 11.3 cm es la altura total de los 500 ml de medio en el vaso de crecimiento. En la Tabla 3.7 , a título de ejemplo se indica la distribución de

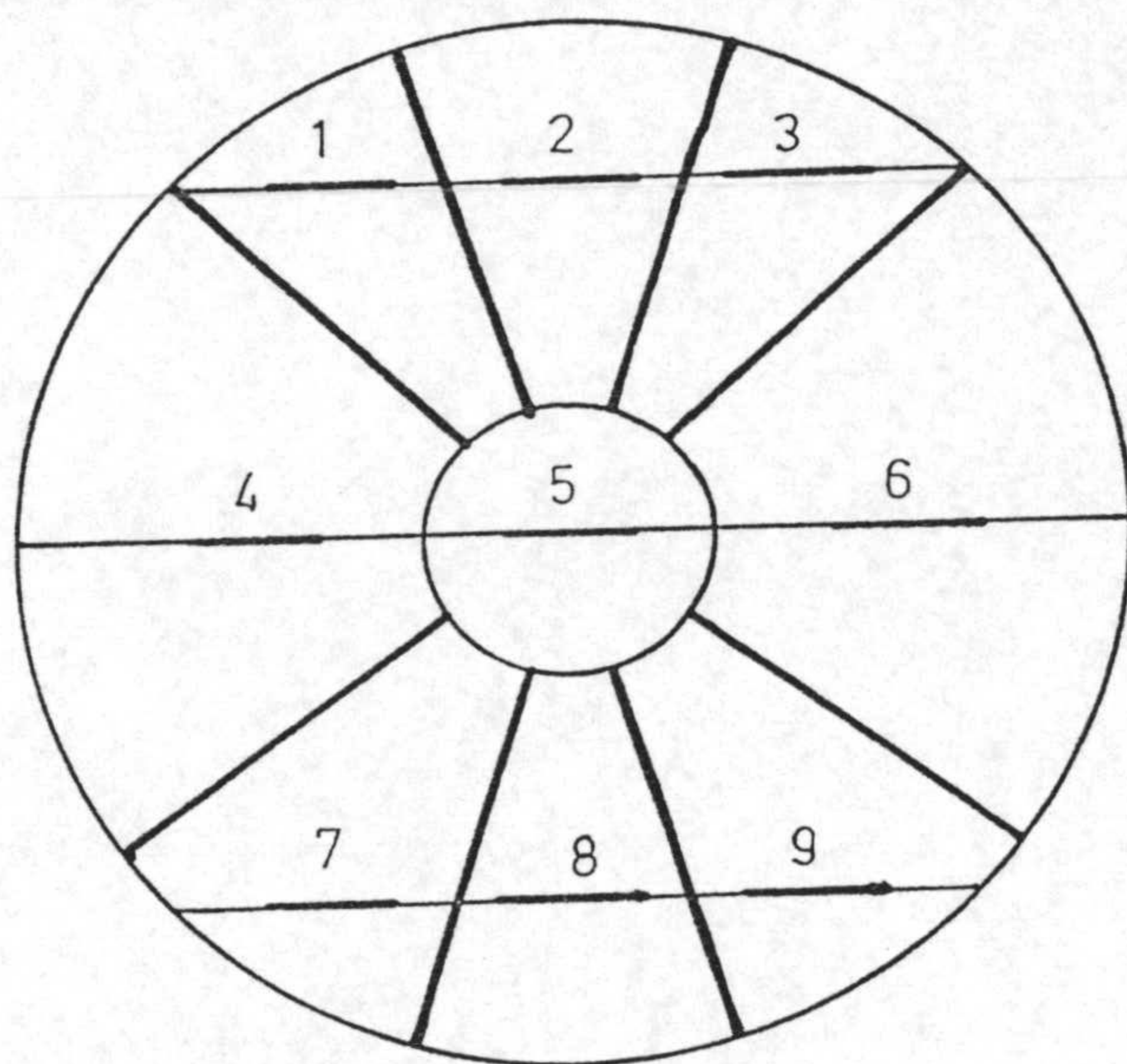


Fig 3.11

TABLA 3.6

Area total = 44.179 cm<sup>2</sup>

Area corona circular = 40.715 cm<sup>2</sup>

<u>célula</u>	<u>grados</u>	<u>area, cm<sup>2</sup></u>
1	28.5	3.223
2	33.0	3.732
3	28.5	3.223
4	82.0	9.274
5	—	3.464
6	82.0	9.274
7	36.5	4.128
8	33.0	3.732
9	36.5	4.128

TABLA 3.7

INTENSIDAD DE ILUMINACION

Intensidades de iluminación puntuales

<u>CELULA</u>	<u>SECCION 1</u>	<u>SECCION 2</u>	<u>SECCION 3</u>	<u>SECCION 4</u>	<u>SECCION 5</u>
N	I,lux	I,lux	I,lux	I,lux	I,lux
1	432	432	425	425	418
2	445	433	424	430	424
3	425	425	410	401	396
4	426	420	420	420	444
5	468	454	454	461	491
6	418	415	395	401	401
7	391	389	383	393	467
8	390	392	392	398	511
9	60	64	63	66	73

Intensidades de iluminación medias por seccion

$$(I_1)= 389 \quad (I_2)= 386 \quad (I_3)= 379 \quad (I_4)= 382 \quad (I_5)= 405$$

INTENSIDAD DE ILUMINACION MEDIA GLOBAL  $I_0 = 389$  LUX

intensidades puntuales de iluminación, así como la intensidad media por secciones y global, calculadas por el procedimiento descrito, para el experimento M.26.

### 3.5 EVALUACION DEL CRECIMIENTO

Para el análisis cinético del crecimiento es preciso disponer de algún parámetro directamente relacionado con el mismo. En esta investigación se han utilizado :

- La absorbancia de la suspensión de células.
- El peso seco de células por unidad de volumen expresado en g/L
- El numero de células por unidad de volumen.

#### 3.5.1 DETERMINACION DE LA ABSORBANCIA DE LA SUSPENSION

Un índice de la concentración celular rápido y fácil de determinar es la absorbancia de la suspensión de células. Estas medidas se han realizado mediante un espectrofotómetro digital SARGENT-WELCH mod. SD a una longitud de onda de 600 nm. La selección de esta longitud de onda basada en el estudio bibliográfico, Samejima y col. (1958), se confirmó tras la realización del espectro completo de una suspensión de las algas utilizadas, siendo ésta la longitud de onda en que la absorbancia era menor.

Durante los experimentos cinéticos se tomaban muestras de la suspensión de células por duplicado a las que se determinaba la absorbancia, utilizando el valor medio de ambas medidas.

#### 3.5.2 DETERMINACION DEL PESO SECO DE CELULAS

Es frecuente en la bibliografía el uso como parámetro de crecimiento del

peso seco de células por unidad de volumen.

La obtención directa de este índice es compleja, ya que obliga a trabajar con volúmenes de cultivo muy grandes a fin de poder tomar muestras que tras centrifugación, lavado y desecación permitan obtener una cantidad de células que puedan pesarse con el menor error posible.

Por todo ello se recurre a la obtención de rectas de calibrado, que hacen posible el conocimiento de este parámetro a través de la lectura espectrofotométrica de la absorbancia.

Para obtener estas rectas de calibrado se determinaron los pesos secos de suspensiones de células de absorbancia conocida en las distintas fases de crecimiento (exponencial y estacionaria) y en cultivos en los que se varió la intensidad de iluminación inicial y concentración de glucosa. Al repetir este procedimiento para los tres tipos de crecimiento estudiado se observó que los valores se ajustaban a una única línea, lo que justifica la utilización de este calibrado para todos los experimentos, independientemente del tipo de crecimiento (fotoheterotrófico, anaerobio y mixotrófico), edad de las células y condiciones de cultivo.

Para determinar la masa seca, se centrifugaba un volumen de 25 a 50 ml de suspensión a 8000 rpm durante 10 minutos, una vez decantado el sobrenadante se realizaban dos lavados sucesivos del residuo celular con agua destilada, a fin de eliminar las sales minerales retenidas. El residuo celular se transfería a un pesasustancias previamente tarado y se desecaba en estufa a 105 °C hasta pesada constante. Los resultados de este calibrado se recogen en la Tabla 3.8 y se han representado en la Figura 3.12. Estos valores se han ajustado por regresión lineal obteniendo la ecuación:

$$c = 0.7294 A \quad r^2 = 0.9789 \quad [3.3]$$

que se ha utilizado en lo sucesivo para la transformación mencionada.

Sin embargo la recta de calibrado obtenida en la zona autotrófica final de los experimentos de crecimiento mixotrófico confirma la recta de calibrado obtenida previamente en cultivos autotróficos Martínez (1980); lo que parece indicar distintas

TABLA 3.8

RECTA DE CALIBRADO		ABSORBANCIA -- PESO SECO	
ABSORBANCIA 600 nm	PESO SECO g/L	ABSORBANCIA 600 nm	PESO SECO g/L
0.036	0.088	0.144	0.082
0.0475	0.019	0.148	0.088
0.053	0.072	0.162	0.094
0.060	0.038	0.207	0.096
0.064	0.064	0.236	0.078
0.065	0.015	0.247	0.160
0.066	0.058	0.257	0.140
0.069	0.068	0.263	0.174
0.070	0.024	0.292	0.228
0.071	0.026	0.360	0.272
0.071	0.068	0.379	0.252
0.072	0.080	0.440	0.314
0.073	0.028	0.452	0.330
0.076	0.032	0.492	0.362
0.0795	0.1	0.545	0.376
0.095	0.066	0.548	0.498
0.1175	0.14	0.630	0.454
0.120	0.128	0.669	0.488
0.124	0.142	0.827	0.588
0.125	0.076	1.955	1.464
0.127	0.106	2.070	1.744
0.127	0.140	2.525	1.64
0.133	0.128		



Recta de calibrado Abs.-Peso seco

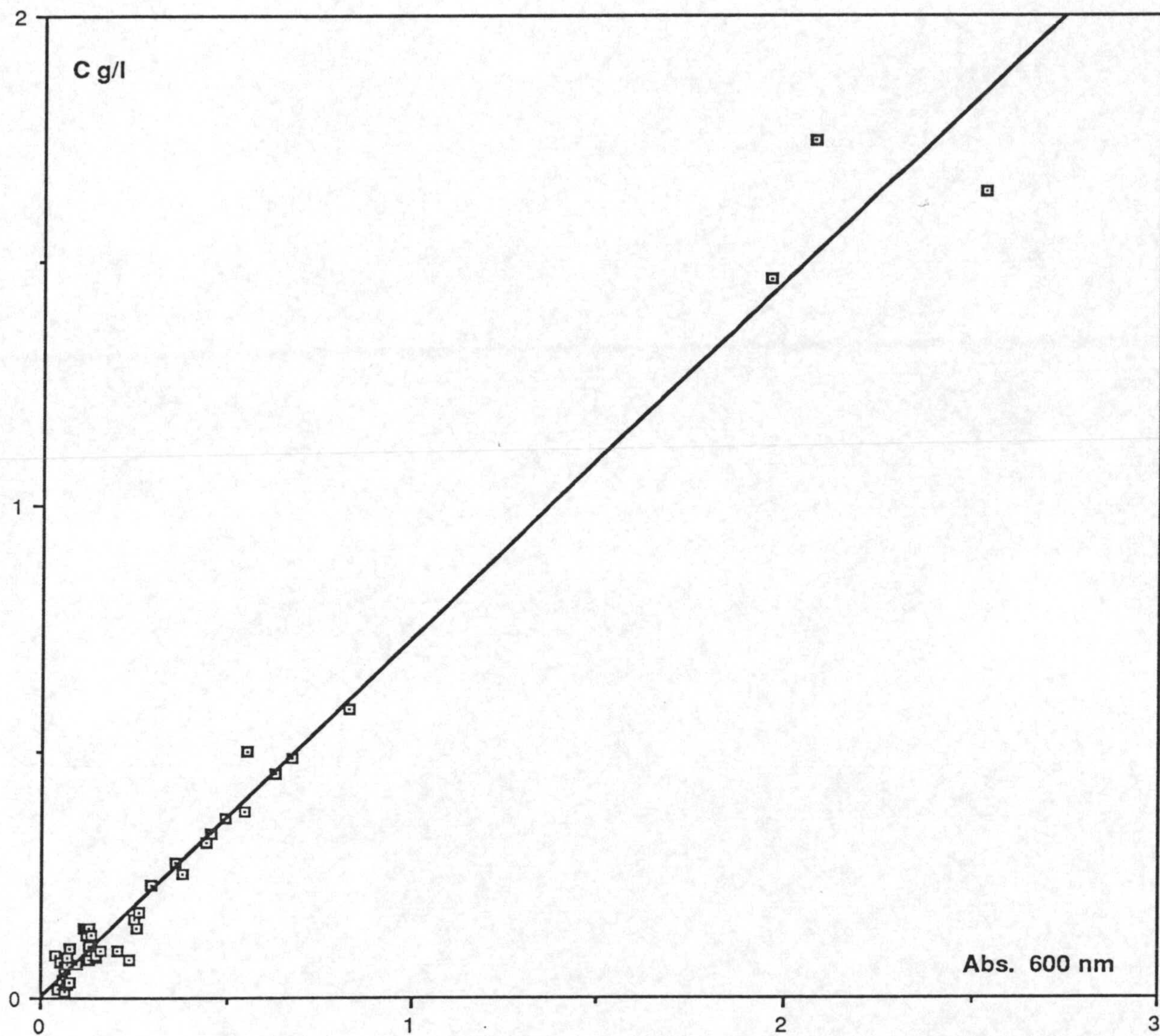


Fig. 3.12

características de extinción de estos cultivos por diferencias fundamentalmente en el contenido en clorofila y tamaño de las células. La ecuación mencionada es:

$$c = 0.4900 A \quad r^2 = 0.999 \quad [3.4]$$

### 3.5.3 CONTAJE CELULAR

En algunos experimentos y simultáneamente a la determinación de la absorbancia de la suspensión se realizó un recuento celular en la misma, Meynell G y col (1969). Se utilizó para ello una cámara de recuento tipo Neubauer, que posee una depresión central de 0.1 mm de profundidad, cuya superficie está dispuesta en cuadrados de 0.0025 mm<sup>2</sup> de área.

El conteo se realizó sobre la diagonal principal de las 16 cuadrículas que componen el retículo, lo que supone el conteo de las células que había en 64 cuadrillos.

La ecuación:

$$\frac{\text{Número total células}}{\text{ml}} = \frac{\text{Número de células } 10^6}{32} \quad [3.5]$$

permite el cálculo de la concentración celular. Este método revistió cierta dificultad, ya que a menudo las autoesporas liberadas por la célula madre (4,8,16) aparecían adheridas unas a otras, complicando extraordinariamente el conteo.

### 3.6 DETERMINACION DEL CONTENIDO EN CLOROFILA

EL contenido en clorofila de la suspensión de células se determinó según el método de Porra (1974).

Este método requiere la extracción de la misma mediante un reactivo piridina-alcalino que convierte el anillo isocíclico del pigmento en una hidroxilactona cíclica.

El procedimiento operatorio se esquematiza en la Figura 3.13. El agente extractor consiste en una disolución 2.1 M de piridina en hidróxido sódico 0.35 N. La principal precaución operatoria consistía en la conservación en oscuridad y sobre hielo de los sobrenadantes hasta finalizada la extracción ya que el derivado de clorofila formado es fotolábil y estas condiciones aseguraban una estabilidad de al menos 60 minutos. De acuerdo con los autores mencionados las absorbancias del extracto, medidas en cubeta de 10 mm de paso óptico a longitudes de onda de 419 y 454 nm, están relacionadas con los contenidos en clorofila a y b expresados en nmol/ml mediante las ecuaciones:

$$A_{419} = 0.01319 C_a + 0.0655 C_b \quad [3.6]$$

$$A_{454} = 0.0158 C_a + 0.159 C_b \quad [3.7]$$

De las ecuaciones anteriores puede obtenerse:

$$C_a = 7.98 A_{419} - 3.29 A_{454} \quad [3.8]$$

$$C_b = 6.22 A_{419} - 0.79 A_{454} \quad [3.9]$$

que permiten determinar los contenidos en clorofila a y b respectivamente, sumando ambas se obtiene:

$$C = 7.19 A_{419} + 3.33 A_{454} \quad [3.10]$$

# EXTRACCION DE LA CLOROFILA

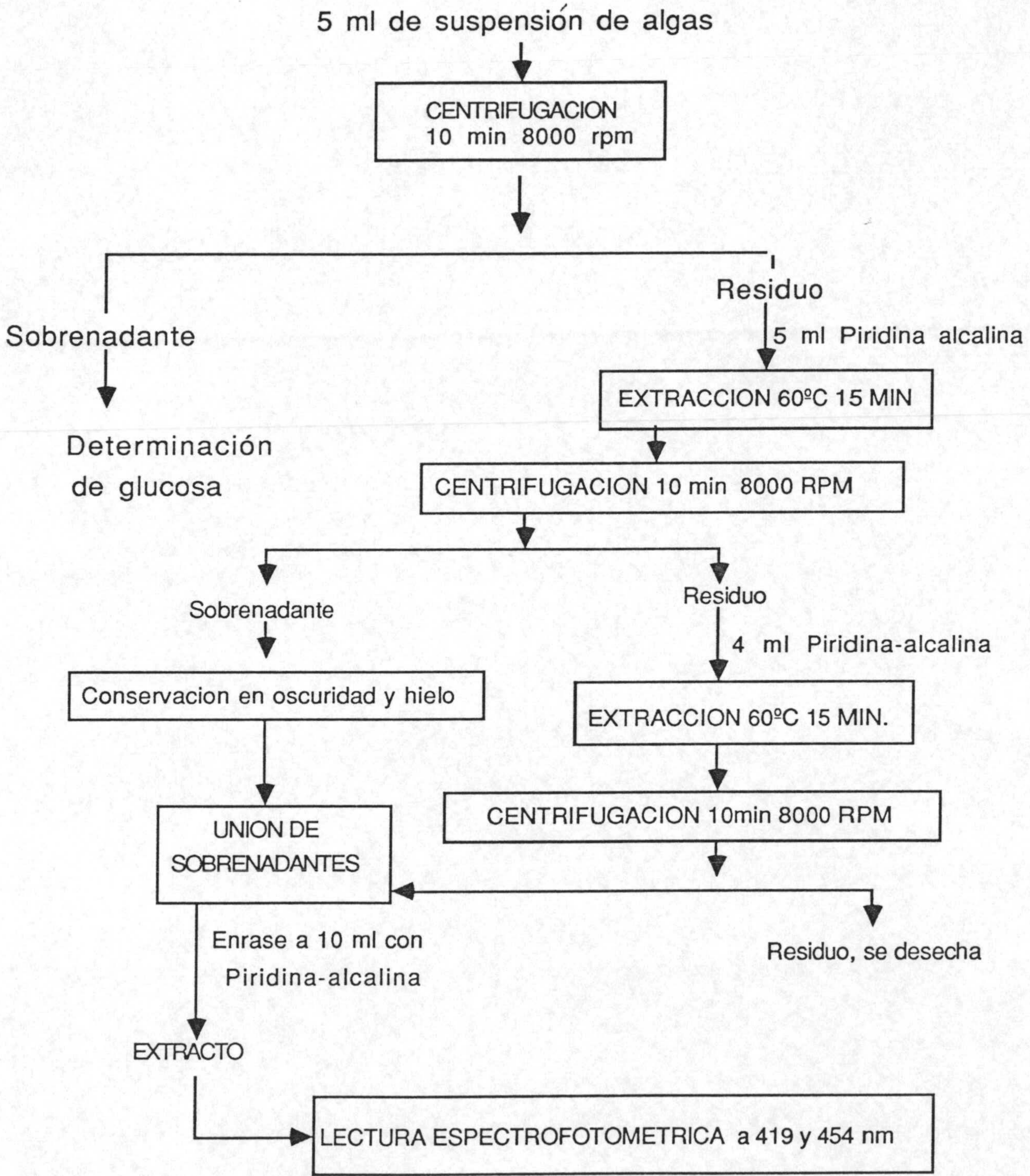


Fig. 3.13

El cálculo del contenido en clorofila de la suspensión de células exigió por tanto la medida de las absorbancias del extracto a 419 y 454 nm en un espectrofotómetro, frente a un blanco de reactivo piridina-alcalino.

El contenido en clorofila en nmol/ml se dedujo de las absorbancias leídas y de la dilución utilizada.

### 3.7 DETERMINACION DEL CONSUMO DE GLUCOSA

Se ha realizado un extenso estudio bibliográfico y experimental de distintos métodos de análisis espectrofotométrico. Entre otros se ha desechado el método de la ANTRONA por presentar interferencias algunos iones existentes en el medio mineral de cultivo.

Finalmente se han seleccionado dos métodos, el SOMOGYI-NELSON, Somogyi. (1937,1951), Nelson (1944) utilizable para intervalos de concentración de 10 a 80 mg/L de glucosa y el de Miller (1956) para el intervalo de 80 a 500 mg/L.

#### 3.7.1 METODO DE SOMOGYI-NELSON

Este método se fundamenta en la capacidad de la glucosa de reducir al ion Cu (II) a Cu (I) en solución alcalina y en caliente, siendo esta reducción proporcional a la cantidad presente en la muestra analizada.

El ion Cu(I) precipita en forma de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (rojo), este precipitado se redisuelve mediante la adición de ion arsenomolibdato que se reduce a ion arsenomolibdito, de intenso color azul, cuya determinación cuantitativa se realiza espectrofotométricamente. Este método utiliza dos reactivos:

##### 1- REACTIVO DE COBRE.

1 litro de este reactivo contiene 4 g de sulfato de cobre pentahidratado, 24 g de carbonato sódico anhidro, 16 g de bicarbonato sódico, 12 g de tartrato sódico potásico (Sal de Rochelle) y 180 g de sulfato sódico anhidro.

Para evitar que se formen trazas de óxido cuproso debidas a posibles impurezas, el reactivo de cobre se prepara en dos soluciones distintas y

separadamente:

SOLUCION I 800 ml

Carbonato sódico anhidro ...24 g  
Tartrato sódico potásico .....12 g  
Bicarbonato sódico ... .....16 g  
Sulfato sódico anhidro ....144 g

SOLUCION II 200 ml

Sulfato de cobre pentahidratado 4 g  
Sulfato sodico anhidro 36 g

El reactivo se prepara uniendo 4 volúmenes de la solución I con 1 volumen de la solución II.

2 - REACTIVO CROMOGENICO

Molibdato amónico ..... 25 g  
Acido sulfúrico concentrado ..... 21 ml  
Arseniato disódico heptahidratado.. 3 g

Se enrasa hasta 500 ml , e incuba en un baño de agua a 37 °C durante 48 horas. Este reactivo debe guardarse en botella de vidrio oscura y cerrada.

Para la determinación de la glucosa del medio de cultivo, tal como se muestra en el esquema Figura 3.14, se tomaban muestras de la suspensión de células a distintos tiempos y se centrifugaban a 8000 rpm durante 10 minutos. El residuo en unos casos se utiliza para la determinación de clorofila y en otros se desecha.

El sobrenadante, si es necesario, se diluye a fin de que la concentración de glucosa estuviese dentro del rango de validez del método.

Un ml del problema se mezcla con un volumen igual de reactivo de cobre en un tubo de ensayo , se introduce en un baño con agua hirviendo durante 15 minutos; se deja enfriar y se le adiciona 1 ml del reactivo cromogénico tratando que se disuelva todo el óxido cuproso formado. Posteriormente se añaden 5 ml de agua

# MÉTODO DE NELSON-SOMOGYI

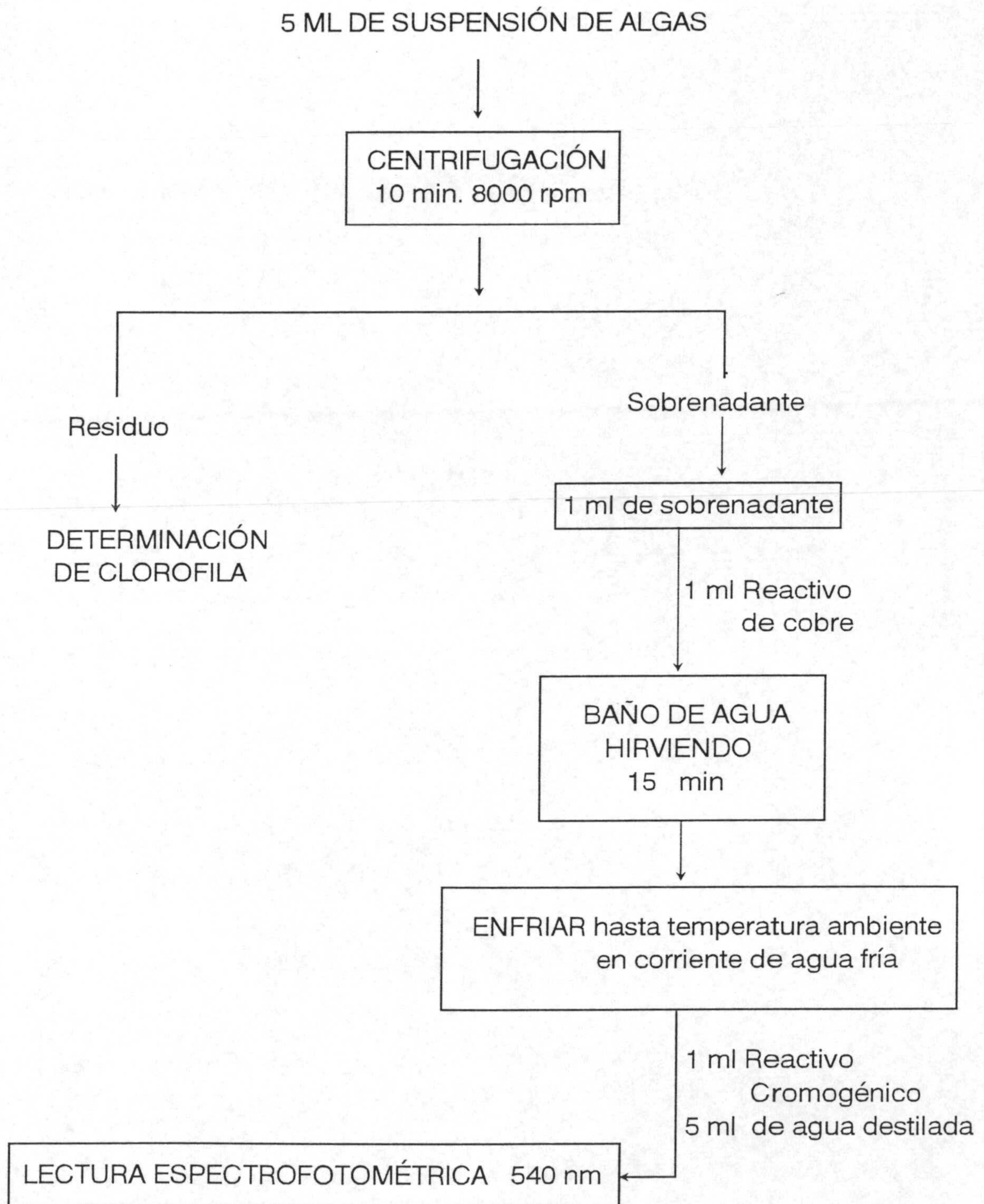


Fig. 3.14



destilada y se procede a su lectura espectrofotométrica, a una longitud de onda de 540 nm frente a un blanco obtenido repitiendo el procedimiento anterior sobre una muestra que contenía solo el medio mineral de cultivo.

El contenido en glucosa de la muestra se determina a partir de la recta de calibrado previamente obtenida a 540 nm. Este método exigió una comprobación constante de la recta de calibrado, ya que se observó una cierta influencia de la edad de los reactivos sobre la misma.

### 3.7.2 METODO DEL ACIDO DINITROSALICILICO

Este método fue desarrollado por Miller..(1959). Se fundamenta en la capacidad de la glucosa de reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico en medio alcalino a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico que origina una intensa coloración marrón en la disolución que puede medirse espectrofotométricamente a 640 nm.

El reactivo utilizado para este análisis es una solución que en un litro contiene:

Acido 3,5-dinitrosalicílico .....	10 g
Fenol .....	2 g
Tartrato sódico potásico .....	200 g
Sulfito sódico .....	1 g
Hidróxido sódico.disolución al 2% ...	500 ml

El proceso operatorio tal como se muestra en el esquema, Figura 3.15, es el siguiente :

Se centrifuga la suspensión de células a 8000 rpm durante 10 minutos. A 2 ml del sobrenadante se le añaden 3 ml de reactivo del ácido dinitrosalicílico y se calienta la mezcla durante 15 minutos en un baño con agua en ebullición.

# METODO DE MILLER

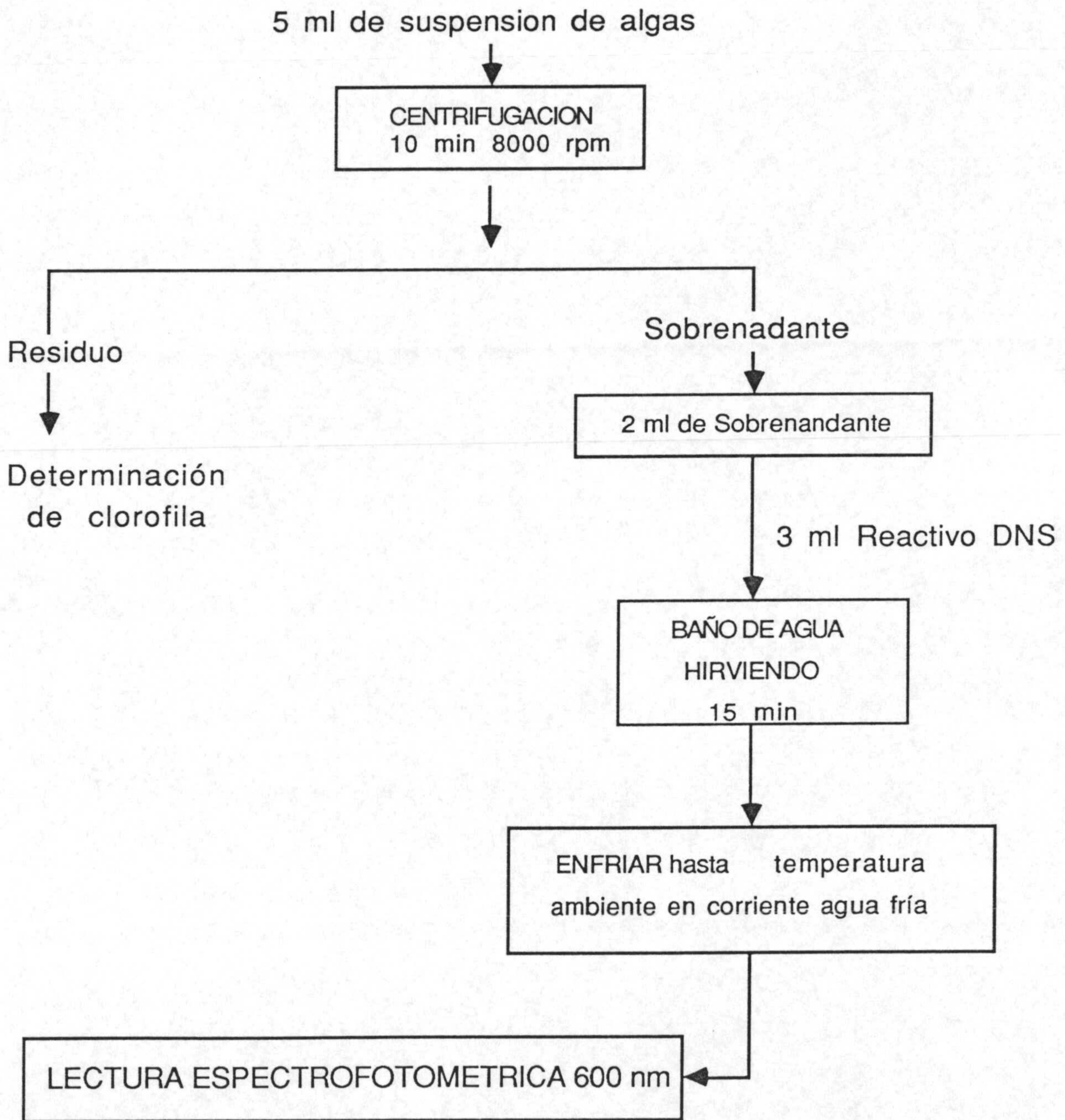


Fig. 3.15

A continuación se enfrían los tubos de ensayo bajo una corriente de agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente, para evitar la desestabilización del color del producto formado por efecto de la temperatura.

La intensidad del color se mide en un espectrofotómetro Bausch & Lomb, mod SPECTRONIC 2000 a 640 nm teniendo como blanco una muestra de medio exento de glucosa y tratada en las mismas condiciones. La concentración en glucosa de las muestras se obtiene por lectura en una recta de calibrado, previamente establecida

## 4. SELECCION DE LAS CONDICIONES DE OPERACION

Las variables investigadas en cuanto a la selección de sus valores óptimos para los crecimientos mixotrófico, fotoheterotrófico y anaerobio del alga unicelular *Chlorella pyrenoidosa* han sido pH del medio de cultivo y temperatura del mismo. En todos los casos para asegurar que la luz no limitara el crecimiento se trabajó a la máxima intensidad de iluminación posible en la instalación descrita en el apartado 3 de esta Memoria, de 2000 lux.

En el estudio del crecimiento heterotrófico de *Chlorella* sobre glucosa realizado también en nuestro Departamento se encontró que la limitación de sustrato sobre el crecimiento se observa para concentraciones de éste inferiores a 0.5 g/L, por esta razón y con objeto de observar esta limitación, sí se produce, en los tipos de crecimiento considerados en esta investigación la mayor parte de los experimentos realizados corresponden a concentraciones de sustrato de 0.1 a 1 g/L.

A continuación se va a describir la secuencia de experimentos realizados para obtener las condiciones óptimas de operación.

Estos experimentos se identifican mediante las letras PH o T que indican la variable investigada y las iniciales F, M y A de los tipos de crecimiento fotoheterotrófico, mixotrófico y anaerobio estudiados. El número que las acompañan indica el orden de realización del experimento.

Los resultados experimentales se van a exponer en forma de tablas, donde una vez identificado el experimento se especifica en la cabecera de las mismas pH o temperatura de trabajo y concentración inicial de sustrato,  $S_0$ . Los datos cinéticos se agrupan en tres columnas, donde la primera representa el tiempo de crecimiento expresado en horas, la segunda, concentración de biomasa en g/L y una tercera columna que representa la concentración adimensional de biomasa.

Esta concentración adimensional,  $C/C_0$ , se ha obtenido como cociente entre la concentración a tiempo  $t$  y la concentración inicial de biomasa,  $C_0$ , obtenida al inocular el medio de cultivo, y su utilización determina un origen común de todas las curvas de crecimiento lo que posibilita una mejor comparación gráfica entre ellas.

## 4.1 INFLUENCIA DEL pH

La influencia del pH se estudió en primer lugar y exhaustivamente sobre el crecimiento fotoheterotrófico, ya que en este tipo de crecimiento y tras la realización de unos experimentos previos, se observó una mayor estabilidad del pH de trabajo seleccionado para todos los valores del mismo.

La concentración de sustrato elegida fue el valor intermedio de 0.5 g/L, analizándose a continuación la influencia de esta variable y de los otros dos tipos de crecimiento: anaerobio y mixotrófico.

La temperatura seleccionada fue 30 °C, valor óptimo, determinado en este Departamento, para el crecimiento de *Chlorella* en condiciones autotróficas.

### 4.1.1 CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Seleccionado este tipo de crecimiento, la influencia del pH se analizó realizando los experimentos PHF.1 a PHF.8 a una concentración inicial de glucosa de 0.5 g/L y a valores de pH de 3; 4; 5; 6.5; 7; 7.5; 8 y 8.5. No se investigaron valores inferiores de pH debido al efecto claramente perjudicial sobre el crecimiento a pH=3 y el límite superior no pudo rebasarse ya que a partir de este valor comienza la precipitación de componentes del medio de cultivo, lo que origina que algunos nutrientes sean inaccesibles al alga ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ) interfiriendo además en la determinación cuantitativa de la absorbancia de la suspensión de células.

Los resultados obtenidos se indican en las Tablas 4.1 y 4.2 y se han representado en coordenadas semilogarítmicas en las Figuras 4.1 y 4.2.

En la primera de estas Figuras se indican los experimentos de pH creciente

TABLA 4.1

INFLUENCIA DEL pH. CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. PHF.1 pH =3 So= 0.5 g/L			Expto. PHF.2 pH= 4 So= 0.5 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.014	1.000	0.00	0.016	1.000
0.00	0.011	0.786	1.00	0.018	1.125
2.75	0.010	0.714	2.00	0.018	1.125
13.25	0.011	0.786	13.50	0.032	2.000
17.50	0.012	0.857	18.00	0.041	2.562
23.00	0.012	0.857	22.25	0.046	2.875
24.00	0.012	0.857	23.25	0.047	2.937
24.75	0.013	0.929	24.00	0.050	3.125
26.50	0.013	0.929	25.50	0.052	3.250
37.25	0.020	1.429	37.75	0.083	5.188
41.25	0.023	1.643	40.50	0.098	6.125
46.75	0.028	2.000	46.50	0.136	8.500
47.75	0.030	2.143	47.50	0.144	9.000
49.00	0.031	2.214	48.50	0.153	9.562
61.25	0.040	2.857	49.50	0.159	9.937
			64.75	0.350	21.875
			71.50	0.343	21.438

Expto. PHF.3 pH =5 So= 0.5 g/L			Expto. PHF.4 pH= 6.5 So= 0.5 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.008	1.000
1.00	0.017	1.133	3.00	0.019	2.375
2.75	0.019	1.267	5.50	0.026	3.250
13.25	0.047	3.133	19.75	0.098	12.250
17.50	0.058	3.867	21.75	0.125	15.625
23.00	0.083	5.533	24.00	0.172	21.500
24.00	0.090	6.000	27.00	0.266	33.250
24.75	0.096	6.400	29.75	0.361	45.125
26.50	0.117	7.800	43.75	0.394	49.250
37.25	0.352	23.467	45.75	0.399	49.875
41.25	0.357	23.800	48.25	0.391	48.875
46.75	0.354	23.600	50.75	0.398	49.750
47.75	0.365	24.333			
49.00	0.360	24.000			
61.25	0.358	23.867			

TABLA 4.2

INFLUENCIA DEL pH. CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. PHF.5 pH =7 So= 0.5 g/L			Expto. PHF.6 pH=7.5 So= 0.5 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.012	1.000	0.00	0.012	1.000
0.50	0.013	1.083	0.50	0.013	1.083
2.25	0.016	1.333	2.25	0.016	1.333
14.75	0.048	4.000	14.75	0.044	3.667
17.25	0.060	5.000	17.25	0.055	4.583
22.75	0.123	10.250	22.75	0.109	9.083
23.75	0.152	12.667	23.75	0.129	10.750
24.50	0.177	14.750	24.75	0.144	12.000
37.25	0.456	38.000	37.25	0.292	24.333
39.75	0.467	38.917	39.75	0.280	23.333
46.75	0.496	41.333	46.75	0.288	24.000
47.75	0.508	42.333	47.75	0.291	24.250
48.50	0.504	42.000	48.50	0.298	24.833
50.25	0.510	42.500	50.25	0.299	24.917

Expto. PHF.7 pH =8 So= 0.5 g/L			Expto. PHF.8 pH= 8.5 So= 0.5 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.011	1.000	0.00	0.012	1.000
1.00	0.012	1.091	0.50	0.012	1.000
2.75	0.016	1.455	2.25	0.014	1.167
13.25	0.041	3.727	14.75	0.038	3.167
17.50	0.053	4.818	17.25	0.042	3.500
23.00	0.086	7.818	22.75	0.069	5.750
24.00	0.098	8.909	23.75	0.078	6.500
24.75	0.109	9.909	24.50	0.083	6.917
26.50	0.139	12.636	37.25	0.144	12.000
37.25	0.334	30.364	39.75	0.152	12.667
41.25	0.354	32.182	46.75	0.180	15.000
46.75	0.356	32.364	47.75	0.180	15.000
47.75	0.365	33.182	48.50	0.182	15.167
49.00	0.361	32.818	50.25	0.193	16.083
61.25	0.357	32.455			



FOTOHETEROTROFICO  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$

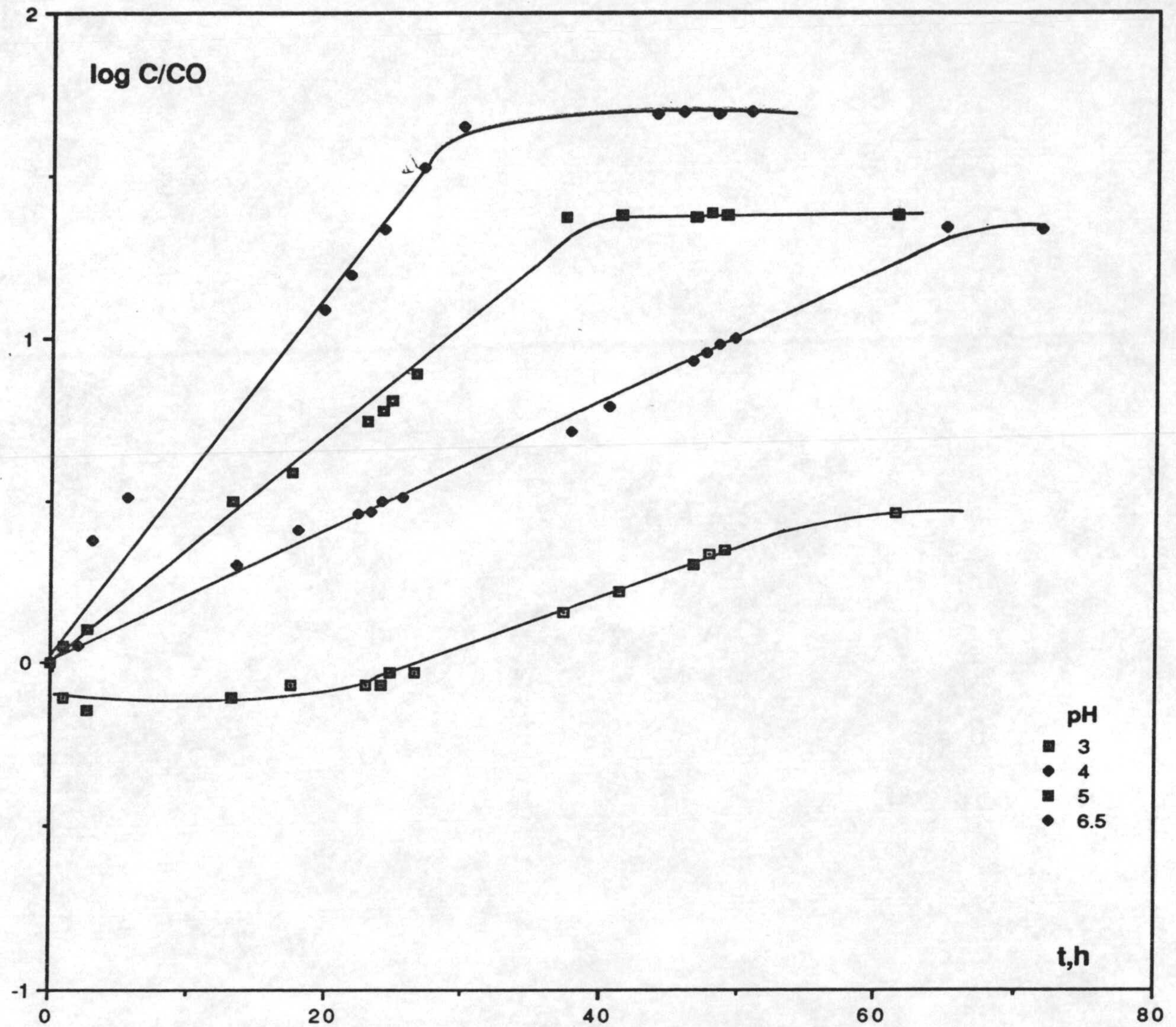


Fig 4.1

FOTOHETEROTROFICO  $S_o = 0.5 \text{ g/l}$

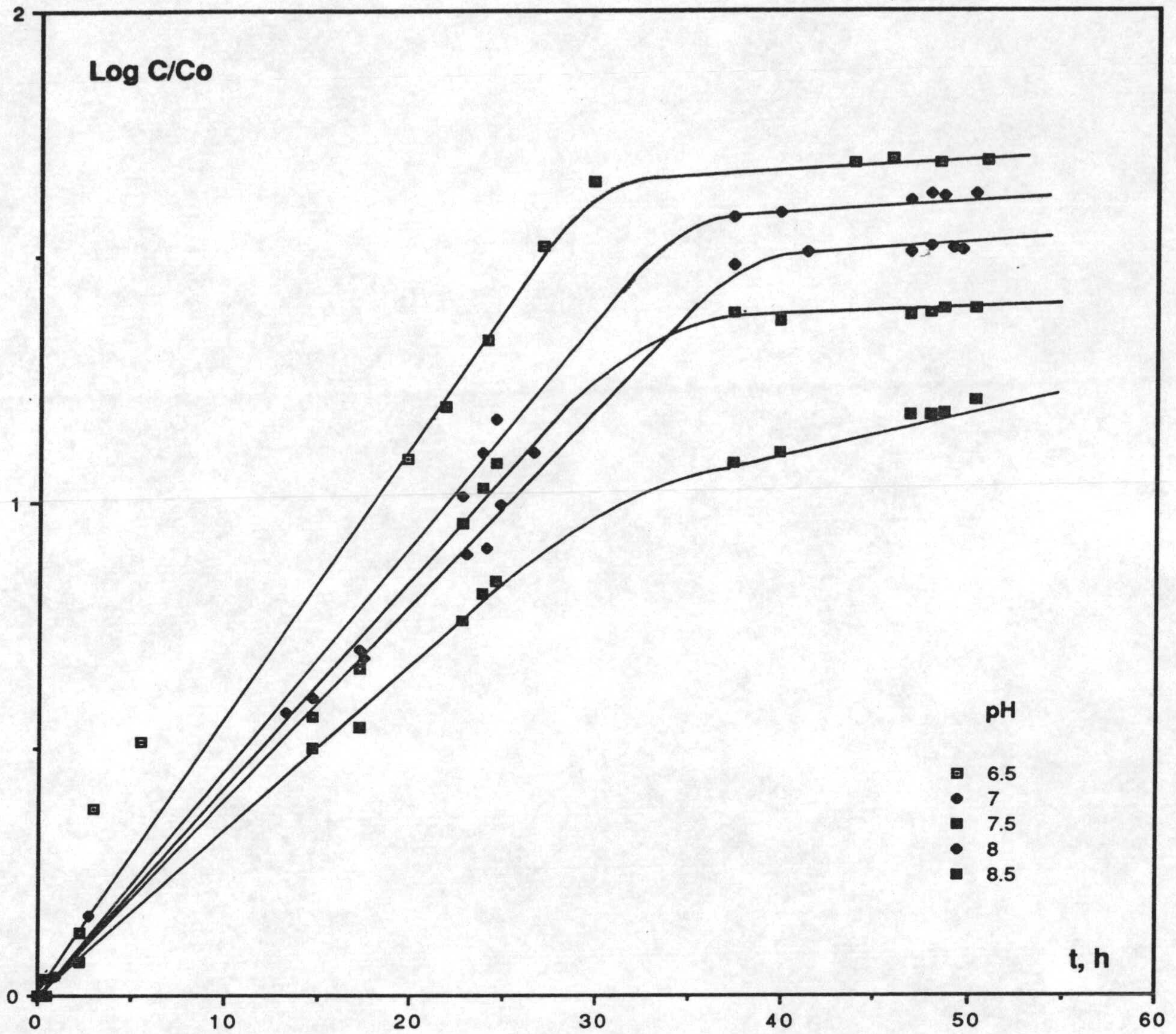


Fig 4.2

hasta 6.5 y en la segunda los experimentos a pH superiores, incluyendo también el de 6.5 con objeto de una mejor comparación.

Todas estas curvas de crecimiento se caracterizan por poseer una zona exponencial perfectamente diferenciada (línea recta en estas coordenadas) y una zona final estacionaria donde la concentración celular alcanza su máximo valor y el crecimiento llega a anularse.

No existe claramente zona lag de adaptación en ninguno de los experimentos, salvo en el de pH=3 donde prácticamente duró 20 horas y en los primeros momentos del mismo hizo pensar que este valor de pH era totalmente desfavorable al crecimiento.

La comparación de las zonas de crecimiento exponencial indica un aumento de las pendientes de estas líneas con el pH hasta un valor máximo a pH=6.5 o próximo a éste, confirmando este óptimo el posterior decrecimiento de las pendientes al aumentar el pH por encima de este valor.

Puede observarse en estas Figuras que la influencia del pH sobre el crecimiento es más acusada a valores del mismo inferiores al óptimo ya que la variación de las pendientes por unidad de pH es superior en este intervalo.

#### 4.1.1.1 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO ORGANICO

Con objeto de determinar si la influencia ejercida por el pH sobre el crecimiento fotoheterotrófico, podría afectarse por el valor de la concentración inicial de sustrato, se realizaron los experimentos PHF.9 y PHF.10 a 0.1 y 1 g/L y un valor de pH de 4. Este pH se seleccionó por la gran duración del experimento.

Los resultados de estos experimentos se indican en la Tabla 4.3 y se han representado en la Figura 4.3. También se ha dibujado una línea continua sin valores experimentales que representa el experimento PHF.2 a pH 4 y concentración inicial de glucosa 0.5 g/L indicado en la Tabla 4.1 .

TABLA 4.3

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE SUSTRATO  
 CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. PHF.9			Expto. PHF.10		
pH =4 So= 0.1 g/L			pH= 4 So= 1 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.016	1.000	0.00	0.014	1.000
1.00	0.017	1.062	1.00	0.015	1.071
2.00	0.015	0.938	2.00	0.016	1.143
13.50	0.020	1.250	13.50	0.032	2.286
18.00	0.026	1.625	18.00	0.039	2.786
22.25	0.030	1.875	22.25	0.044	3.143
23.25	0.031	1.937	23.25	0.046	3.286
24.00	0.034	2.125	24.00	0.048	3.429
25.50	0.035	2.187	25.50	0.050	3.571
37.75	0.061	3.812	37.75	0.094	6.714
40.50	0.068	4.250	40.50	0.111	7.929
46.50	0.091	5.688	46.50	0.157	11.214
47.50	0.091	5.688	47.50	0.167	11.929
48.50	0.094	5.875	48.50	0.174	12.429
49.50	0.093	5.812	49.50	0.185	13.214
64.75	0.098	6.125	64.75	0.463	33.071
71.50	0.104	6.500	71.50	0.470	33.571

Fotoheterotrófico pH = 4

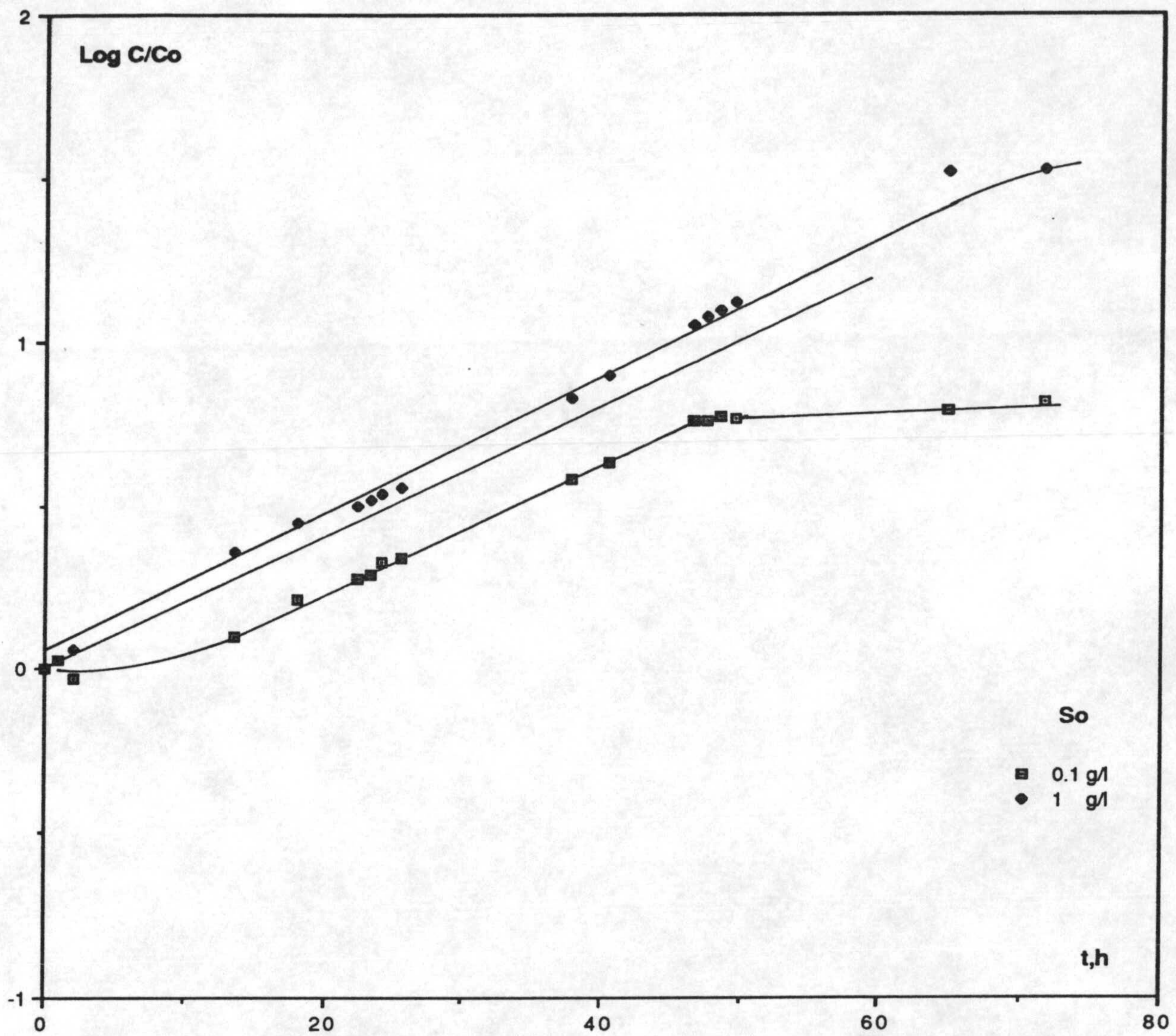


Fig. 4.3

La pendiente de las curvas de crecimiento no se afecta significativamente a este valor de pH por la concentración inicial de glucosa. Aunque las diferencias son claras en cuanto a los valores finales de la concentración de biomasa alcanzadas en la zona estacionaria, como era de esperar ya que esta zona corresponde al consumo total de sustrato orgánico. También parece observarse una fase lag más apreciable al disminuir la concentración inicial de sustrato.

Este resultado indica que la influencia del pH sobre la velocidad de crecimiento no es afectada por la concentración de sustrato, al menos en el intervalo estudiado.

#### 4.1.2 CRECIMIENTO ANAEROBIO

Para estudiar la influencia del pH sobre el crecimiento anaerobio se realizaron los experimentos PHA.11, PHA.12 y PHA.13 a 0.1, 0.5 y 1 g/L de glucosa respectivamente y pH 4, cuyos resultados se indican en la Tabla 4.4 .

Estos valores experimentales se han representado en la Figura 4.4 .Siendo las pendientes de la fase exponencial 0.0225, 0.0204 y 0.0201 respectivamente. Aunque con una ligera dispersión que origina que no partan todas las curvas del mismo punto, puede observarse que las pendientes de las distintas zonas exponenciales de crecimiento son muy próximas y similares a las del crecimiento fotoheterotrófico a 0.5 g/L representado por la línea continua sin valores experimentales. A la vista de estos hechos podemos concluir que la influencia del pH no se afecta ni por la concentración de sustrato ni por el tipo de crecimiento fotoheterotrófico o anaerobio.

TABLA 4.4

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE SUSTRATO  
CRECIMIENTO ANAEROBIO

Expto. PHA.11 pH =4 So= 0.1 g/L			Expto. PHA.12 pH= 4 So= 0.5 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.009	1.000	0.00	0.009	1.000
1.00	0.010	1.111	1.00	0.010	1.111
1.50	0.011	1.222	1.50	0.010	1.111
2.00	0.011	1.222	2.00	0.012	1.333
12.25	0.024	2.667	12.25	0.023	2.556
16.25	0.026	2.889	16.25	0.026	2.889
21.00	0.036	4.000	21.00	0.031	3.444
24.00	0.042	4.667	24.00	0.031	3.444
25.50	0.048	5.333	25.50	0.035	3.889
36.25	0.088	9.778	36.25	0.055	6.111
40.25	0.090	10.000	40.25	0.069	7.667
46.00	0.096	10.667	46.00	0.088	9.778
47.00	0.093	10.333	47.00	0.093	10.333
48.00	0.093	10.333	48.00	0.098	10.889
49.00	0.092	10.222	49.00	0.104	11.556
60.25	0.096	10.667	60.25	0.289	32.111
63.75	0.096	10.667	63.75	0.287	32.111

Expto. PHA.13					
pH =4			So= 1 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C, g/L	C/Co
0.00	0.009	1.000	49.00	0.155	19.375
1.00	0.009	1.125	49.75	0.170	21.250
1.50	0.010	1.250	60.25	0.489	61.125
2.00	0.011	1.375	63.75	0.518	64.750
12.25	0.025	3.125			
16.25	0.030	3.750			
21.00	0.036	4.500			
24.00	0.038	4.750			
25.50	0.044	5.500			
36.25	0.068	8.500			
40.25	0.082	10.250			
46.00	0.117	14.625			
47.00	0.130	16.250			
48.00	0.140	17.500			

Anaerobio pH = 4

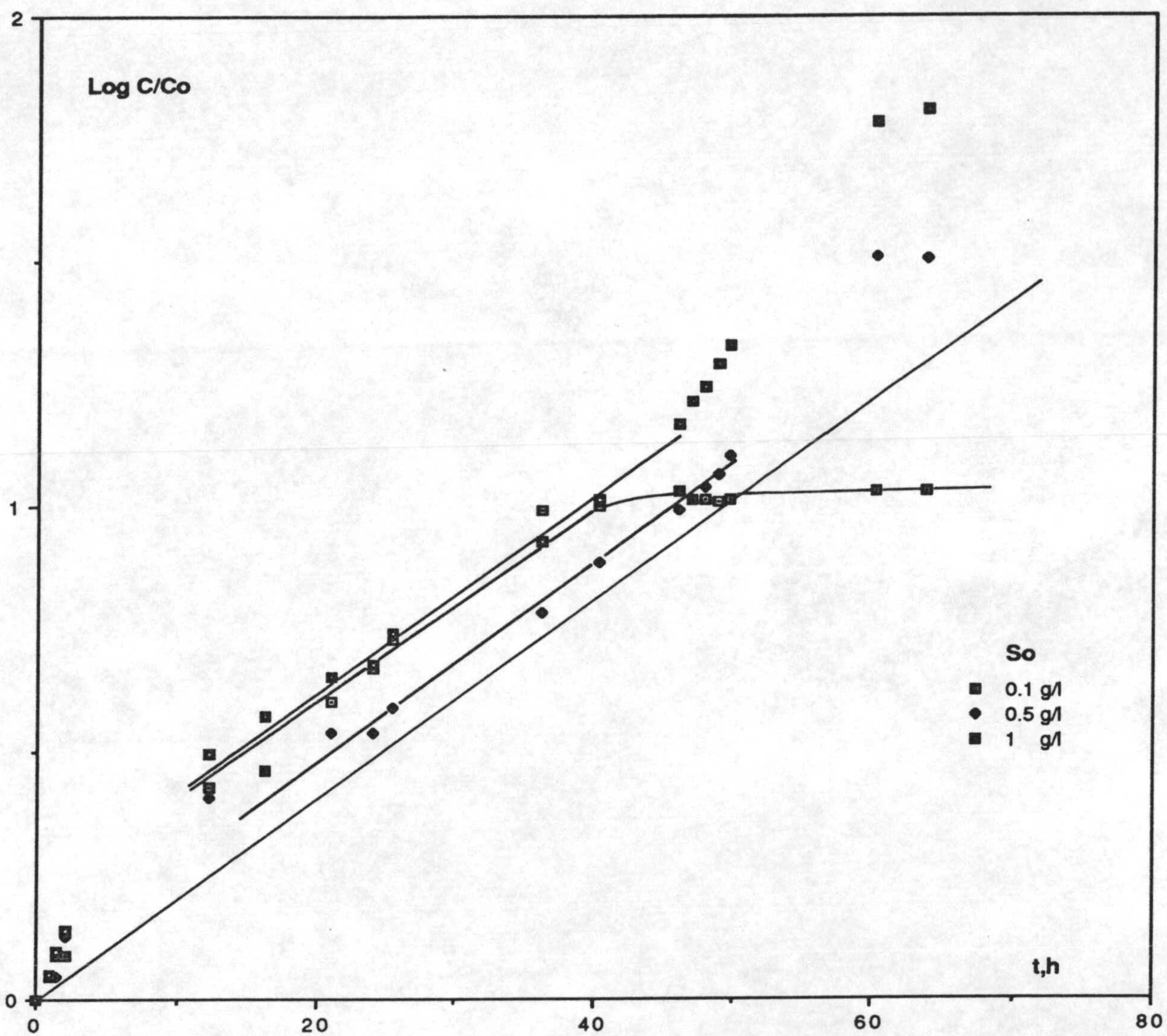


Fig 4.4



#### 4.1.3 CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Para estudiar la influencia del pH sobre el crecimiento mixotrófico se realizaron los experimentos PHM.14, PHM.15 y PHM.16 a valores de pH de 5 y 7.5 . Todos estos experimentos se realizaron a la concentración intermedia de glucosa de 0.5 g/L.

Los resultados de estas experiencias se indican en la Tabla 4.5 y se representan en las Figuras 4.5 para pH 5 y 4.6 para pH 7.5 .Las pendientes de la fase exponencial son 0.0310, 0.0338 y 0.0419.

En ambas gráficas se han representado como líneas continuas sin valores experimentales los experimentos PHF.3 y PHF.6 en condiciones fotoheterotróficas que sirven de referencia. En las dos Figuras se observa coincidencia en los valores de las pendientes de las zonas exponenciales, sin embargo a  $\text{pH} = 7.5$ , existe discontinuidad entre la zona exponencial y estacionaria debido a una cierta contaminación bacteriana.

Los resultados comentados en los apartados 4.1.2 y 4.1.3 ponen de manifiesto que la influencia del pH es la misma para los tres tipos de crecimiento considerados y por lo tanto que también lo es el valor óptimo de 6.5 .

TABLA 4.5

INFLUENCIA DEL PH. CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. PHM.14 pH =5 So= 0.5 g/L			Expto. PHM.15 pH= 5 So= 0.5 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.011	1.000	0.00	0.012	1.000
0.50	0.010	0.909	0.50	0.012	1.000
1.00	0.009	0.818	1.00	0.013	1.083
1.50	0.011	1.000	1.50	0.014	1.167
12.00	0.031	2.818	12.00	0.032	2.667
16.00	0.039	3.545	16.00	0.040	3.333
20.50	0.055	5.000	20.50	0.055	4.583
21.00	0.057	5.182	21.00	0.061	5.083
21.50	0.058	5.273	21.50	0.065	5.417
24.25	0.073	6.636	24.25	0.080	6.667
25.00	0.079	7.182	25.00	0.088	7.333
25.50	0.082	7.455	25.50	0.098	8.167
36.00	0.170	15.455	36.00	0.109	9.083
40.75	0.208	18.909	40.75	0.117	9.750
44.75	0.266	24.182	44.75	0.124	10.333
45.75	0.279	25.364	45.75	0.120	10.000
47.00	0.299	27.182	47.00	0.091	7.583
48.50	0.303	27.545	48.50	0.093	7.750
60.00	0.321	29.182	60.00	0.134	11.167
63.75	0.240	21.818	63.75	0.169	14.083
69.00	0.260	23.636	69.00	0.223	18.583

Expto. PHM.16 pH =7.5 So= 0.5 g/L					
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.012	1.000	25.00	0.288	24.000
0.50	0.012	1.000	25.50	0.295	24.583
1.00	0.013	1.083	36.00	0.375	31.250
1.50	0.014	1.167	40.75	0.372	31.000
12.00	0.038	3.167	44.75	0.384	32.000
16.00	0.055	4.583	45.75	0.394	32.833
20.50	0.123	10.250	47.00	0.273	22.750
21.00	0.137	11.417	48.50	0.277	23.083
21.50	0.156	13.000	60.00	0.429	35.750
24.25	0.270	22.500	63.75	0.479	39.917
			69.00	0.544	45.333

TABLA 4.5

INFLUENCIA DEL PH. CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. PHM.14 pH =5 So= 0.5 g/L			Expto. PHM.15 pH= 5 So= 0.5 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.011	1.000	0.00	0.012	1.000
0.50	0.010	0.909	0.50	0.012	1.000
1.00	0.009	0.818	1.00	0.013	1.083
1.50	0.011	1.000	1.50	0.014	1.167
12.00	0.031	2.818	12.00	0.032	2.667
16.00	0.039	3.545	16.00	0.040	3.333
20.50	0.055	5.000	20.50	0.055	4.583
21.00	0.057	5.182	21.00	0.061	5.083
21.50	0.058	5.273	21.50	0.065	5.417
24.25	0.073	6.636	24.25	0.080	6.667
25.00	0.079	7.182	25.00	0.088	7.333
25.50	0.082	7.455	25.50	0.098	8.167
36.00	0.170	15.455	36.00	0.109	9.083
40.75	0.208	18.909	40.75	0.117	9.750
44.75	0.266	24.182	44.75	0.124	10.333
45.75	0.279	25.364	45.75	0.120	10.000
47.00	0.299	27.182	47.00	0.091	7.583
48.50	0.303	27.545	48.50	0.093	7.750
60.00	0.321	29.182	60.00	0.134	11.167
63.75	0.240	21.818	63.75	0.169	14.083
69.00	0.260	23.636	69.00	0.223	18.583

Expto. PHM.16 pH =7.5 So= 0.5 g/L					
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.012	1.000	25.00	0.288	24.000
0.50	0.012	1.000	25.50	0.295	24.583
1.00	0.013	1.083	36.00	0.375	31.250
1.50	0.014	1.167	40.75	0.372	31.000
12.00	0.038	3.167	44.75	0.384	32.000
16.00	0.055	4.583	45.75	0.394	32.833
20.50	0.123	10.250	47.00	0.273	22.750
21.00	0.137	11.417	48.50	0.277	23.083
21.50	0.156	13.000	60.00	0.429	35.750
24.25	0.270	22.500	63.75	0.479	39.917
			69.00	0.544	45.333

Mixotrófico,  $S_o=0.5$  g/L, pH = 5

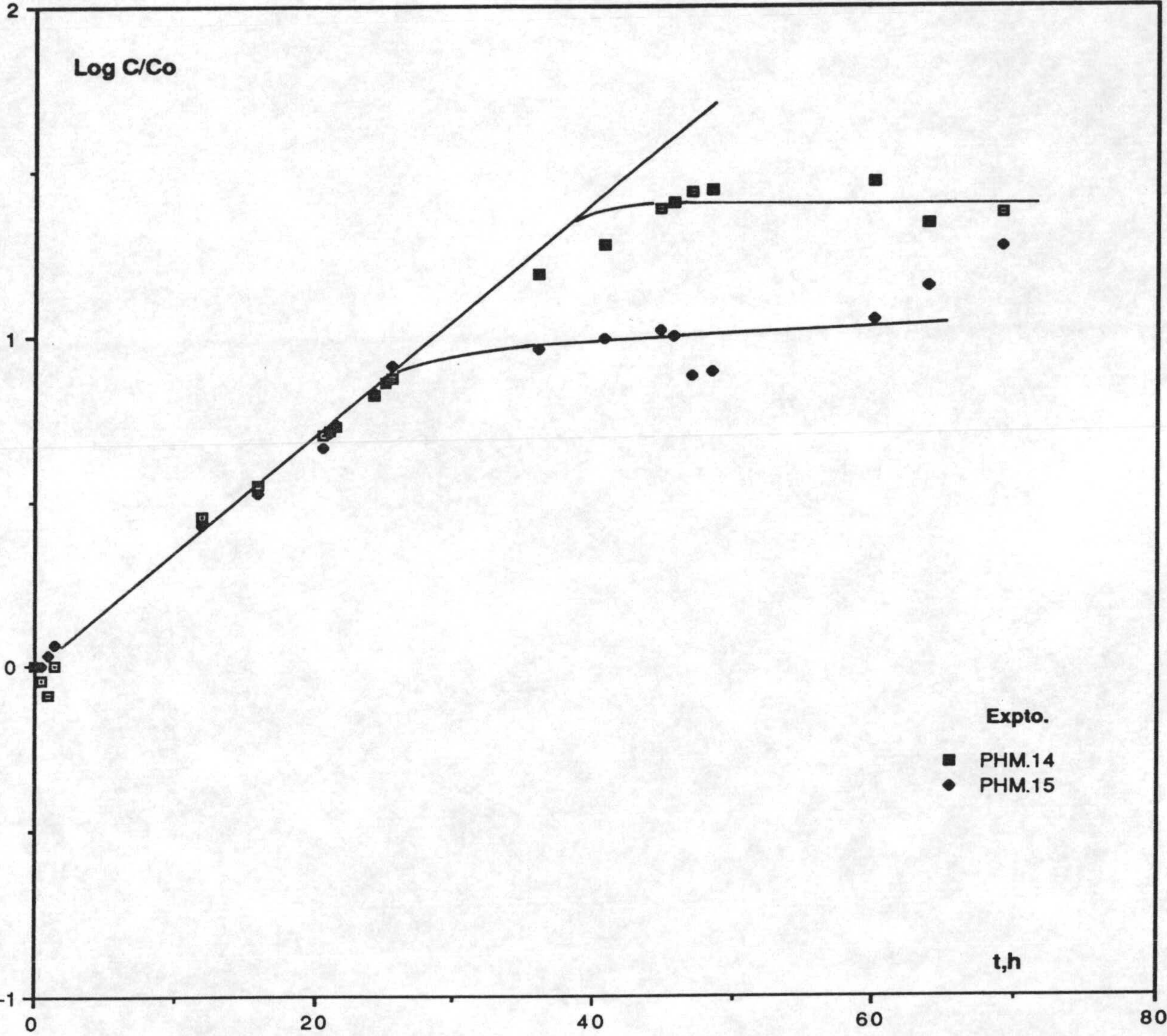


Fig 4.5

Mixotrófico,  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$ ,  $\text{pH} = 7.5$

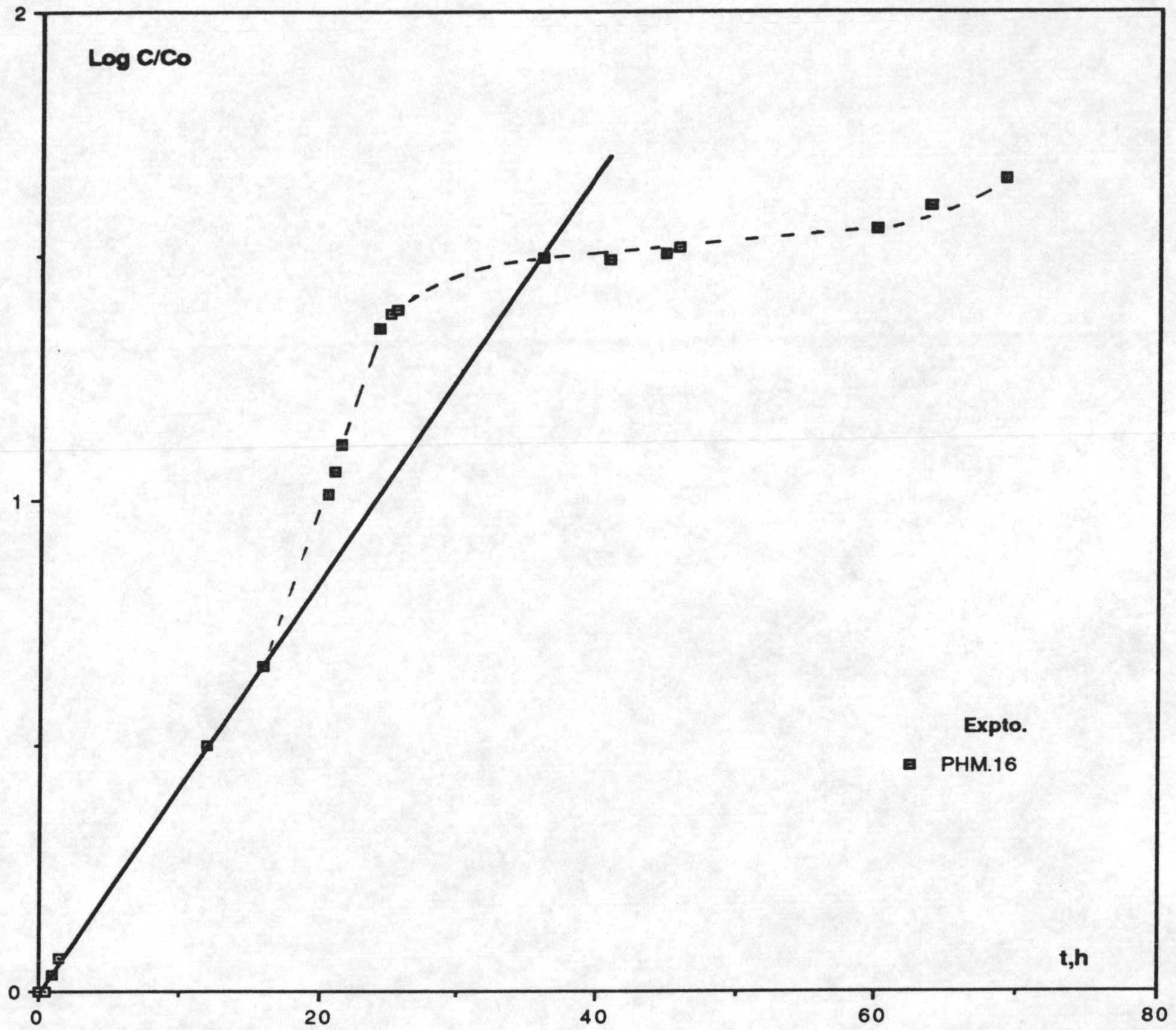


Fig 4.6

## 4.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Como ya se ha indicado, otra variable investigada para la selección de su valor óptimo fue la temperatura. El intervalo de exploración seleccionado fue entre 25 y 35°C para los tres tipos de crecimiento y variando la concentración de glucosa de 0.1 a 1 g/L. Todos los experimentos se realizaron a un valor de pH constante e igual a 6.5 y a una intensidad inicial de iluminación de 2000 lux.

Los experimentos realizados se indican en la siguiente Tabla resumen:

<u>Expto</u>	<u>T, °C</u>	<u>So, g/L</u>	<u>Tipo de crecimiento</u>
TF.1	25	0.1	Fotoheterotrófico
TF.2	25	1	Fotoheterotrófico
TM.3	27.5	0.5	Mixotrófico
TA.4	27.5	0.5	Anaerobio
TM.5	30	0.5	Mixotrófico
TM.6	32.5	0.1	Mixotrófico
TM.7	32.5	0.5	Mixotrófico
TA.8	32.5	0.5	Anaerobio
TM.9	35	0.1	Mixotrófico
TF.10	35	0.5	Fotoheterotrófico

y los resultados obtenidos para cada uno de ellos se indican en las Tablas 4.6, a 4.10

En este intervalo de temperatura la influencia sobre la cinética del crecimiento es pequeña; sin embargo los resultados experimentales indican que el crecimiento óptimo se produce alrededor de los 30°C. Este hecho puede observarse en la Figura 4.7 donde se han representado los datos cinéticos de los experimentos TM.3, TM.5 y TM.7 correspondientes a crecimiento mixotrófico a las temperaturas de 27.5, 30 y 32.5°C a una concentración inicial de glucosa de 0.5 g/L.

TABLA 4.6

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Expto. TF.1			Expto. TF.2		
T= 25°C So= 0.1 g/L			T= 25°C So= 1 g/L		
t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.014	1.000
0.50	0.011	0.733	0.50	0.013	0.929
1.50	0.012	0.800	1.50	0.015	1.071
2.50	0.013	0.867	2.50	0.017	1.214
3.50	0.015	1.000	3.50	0.018	1.286
4.50	0.018	1.200	4.50	0.020	1.429
5.50	0.018	1.200	5.50	0.021	1.500
7.50	0.020	1.333	7.50	0.023	1.643
8.50	0.022	1.467	8.50	0.026	1.857
10.00	0.024	1.600	10.00	0.028	2.000
12.00	0.028	1.867	12.00	0.036	2.571
23.25	0.069	4.600	23.25	0.080	5.714
27.00	0.095	6.333	27.00	0.106	7.571
28.25	0.104	6.933	28.25	0.118	8.429
29.25	0.112	7.467	29.25	0.132	9.429
31.50	0.106	7.067	31.50	0.172	12.286
33.00	0.109	7.267	33.00	0.202	14.429
34.00	0.115	7.667	34.00	0.244	17.429
35.00	0.112	7.467	35.00	0.290	20.714
47.00	0.114	7.600	47.00	0.525	37.500

TABLA 4.7

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Expto. TM.3

Expto. TA.4

T= 27.5°C So= 0.5 g/L

T= 27.5°C So=0.5 g/L

t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.010	1.000
0.50	0.015	1.000	0.50	0.010	1.000
1.25	0.016	1.067	1.00	0.012	1.200
12.00	0.032	2.133	11.50	0.026	2.600
14.00	0.036	2.400	12.00	0.028	2.800
15.00	0.040	2.667	12.50	0.029	2.900
16.00	0.042	2.800	13.00	0.031	3.100
16.50	0.044	2.933	15.00	0.034	3.400
17.00	0.044	2.933	16.25	0.036	3.600
18.00	0.048	3.200	18.00	0.042	4.200
19.00	0.053	3.533	21.00	0.054	5.400
19.75	0.056	3.733	22.75	0.066	6.600
21.00	0.063	4.200	24.00	0.080	8.000
22.00	0.069	4.600	24.50	0.085	8.500
23.75	0.080	5.333	35.75	0.275	27.500
24.25	0.089	5.933	36.50	0.274	27.400



TABLA 4.8

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Expto. TM.5

Expto. TM.6

T= 30°C So= 0.5 g/L

T= 32.5°C So= 0.1 g/L

t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.013	1.000	0.00	0.015	1.000
1.00	0.015	1.154	0.50	0.016	1.067
1.50	0.016	1.231	1.25	0.018	1.200
2.50	0.020	1.538	12.00	0.048	3.200
13.00	0.058	4.462	14.00	0.057	3.800
13.50	0.063	4.846	15.00	0.062	4.133
16.33	0.079	6.077	16.00	0.067	4.467
17.50	0.088	6.769	16.50	0.069	4.600
21.75	0.140	10.769	17.00	0.071	4.733
22.50	0.150	11.538	18.00	0.78	5.200
23.50	0.168	12.923	19.00	0.089	5.933
24.75	0.194	14.923	19.75	0.098	6.533
25.50	0.213	16.385	21.00	0.106	7.067
26.50	0.239	18.385	22.00	0.073	4.867
37.50	0.403	31.000	23.75	0.080	5.333
41.50	0.351	27.000	24.25	0.083	5.533
45.50	0.425	32.692			
47.50	0.466	35.846			
48.50	0.454	34.923			
63.75	0.679	52.231			

TABLA 4.9

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Expto. TM.7

Expto. TA.8

T= 32.5°C So= 0.5 g/L

T= 32.5°C So= 0.5 g/L

t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.014	1.000	0.00	0.016	1.000
0.50	0.015	1.071	0.50	0.016	1.000
1.25	0.017	1.214	1.00	0.018	1.125
12.00	0.046	3.286	11.50	0.047	2.937
14.00	0.054	3.857	12.00	0.051	3.187
15.00	0.055	3.929	12.50	0.055	3.437
16.00	0.061	4.357	13.00	0.059	3.687
16.50	0.066	4.714	15.00	0.071	4.437
17.00	0.067	4.786	16.25	0.080	5.000
18.00	0.079	5.643	18.00	0.128	8.000
19.00	0.088	6.286	21.00	0.226	14.125
19.75	0.096	6.857	22.75	0.290	18.125
21.00	0.112	8.000	24.00	0.298	18.625
22.00	0.127	9.071	24.50	0.301	18.813
23.75	0.167	11.929	35.75	0.306	19.125
24.25	0.181	12.929	36.50	0.306	19.125

TABLA 4.10

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Expto. TM.9

Expto. TF.10

T=35°C So= 0.1 g/L

T= 35°C So= 0.5 g/L

t,h	C,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.013	1.000	0.00	0.014	1.000
1.00	0.015	1.154	0.50	0.015	1.071
2.00	0.018	1.385	1.50	0.016	1.143
3.00	0.021	1.615	2.50	0.018	1.286
4.00	0.023	1.769	3.50	0.022	1.571
5.00	0.026	2.000	4.50	0.024	1.714
6.50	0.029	2.231	5.50	0.026	1.857
7.50	0.032	2.462	7.50	0.031	2.214
8.50	0.036	2.769	8.50	0.034	2.429
9.50	0.039	3.000	10.00	0.039	2.786
10.50	0.044	3.385	12.00	0.048	3.429
23.25	0.093	7.154	23.25	0.139	9.929
24.00	0.095	7.308	27.00	0.252	18.000
24.75	0.100	7.692	28.25	0.250	17.857
25.25	0.102	7.846	29.25	0.252	18.000
25.75	0.104	8.000	31.50	0.252	18.000
26.25	0.110	8.462			

Mixotrófico,  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$

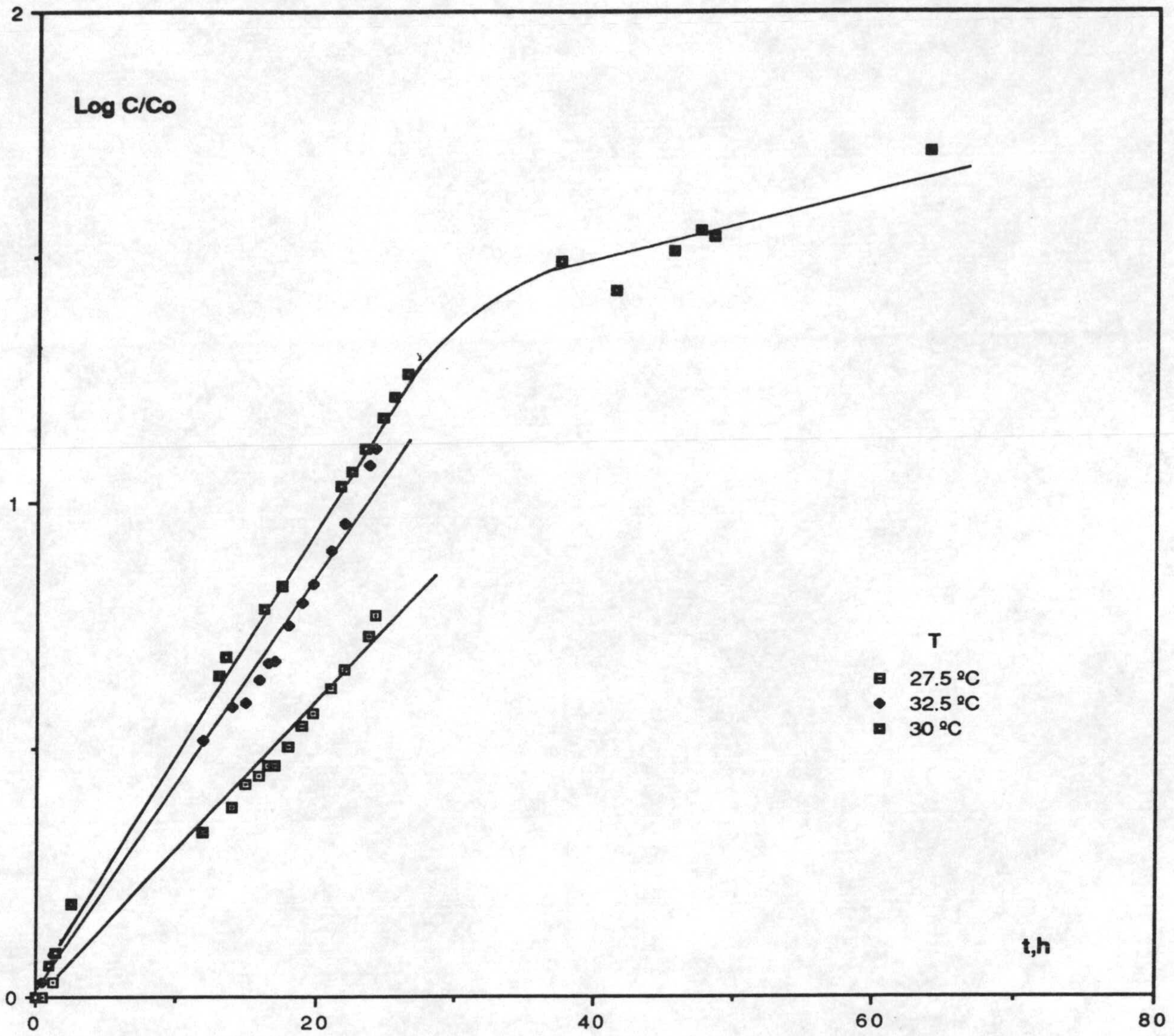


Fig 4.7

Las pendientes de la zona exponencial de estos experimentos son:

<u>Expto.</u>	<u>Pendiente</u>
TF.1	0.0310
TF.2	0.0322
TM.3	0.0341
TA.4	0.0349
TM.5	0.0464
TM.6	0.0398
TM.7	0.04151
TA.8	0.0429
TM.9	0.0419
TF.10	0.0409

De igual forma que ocurría con la influencia del pH este valor óptimo parece ser independiente del tipo de crecimiento y de la concentración inicial de sustrato, como se verá en el apartado 6 al interpretar cuantitativamente los resultados obtenidos en estos experimentos.

FOTOHETEROTROFICO  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$

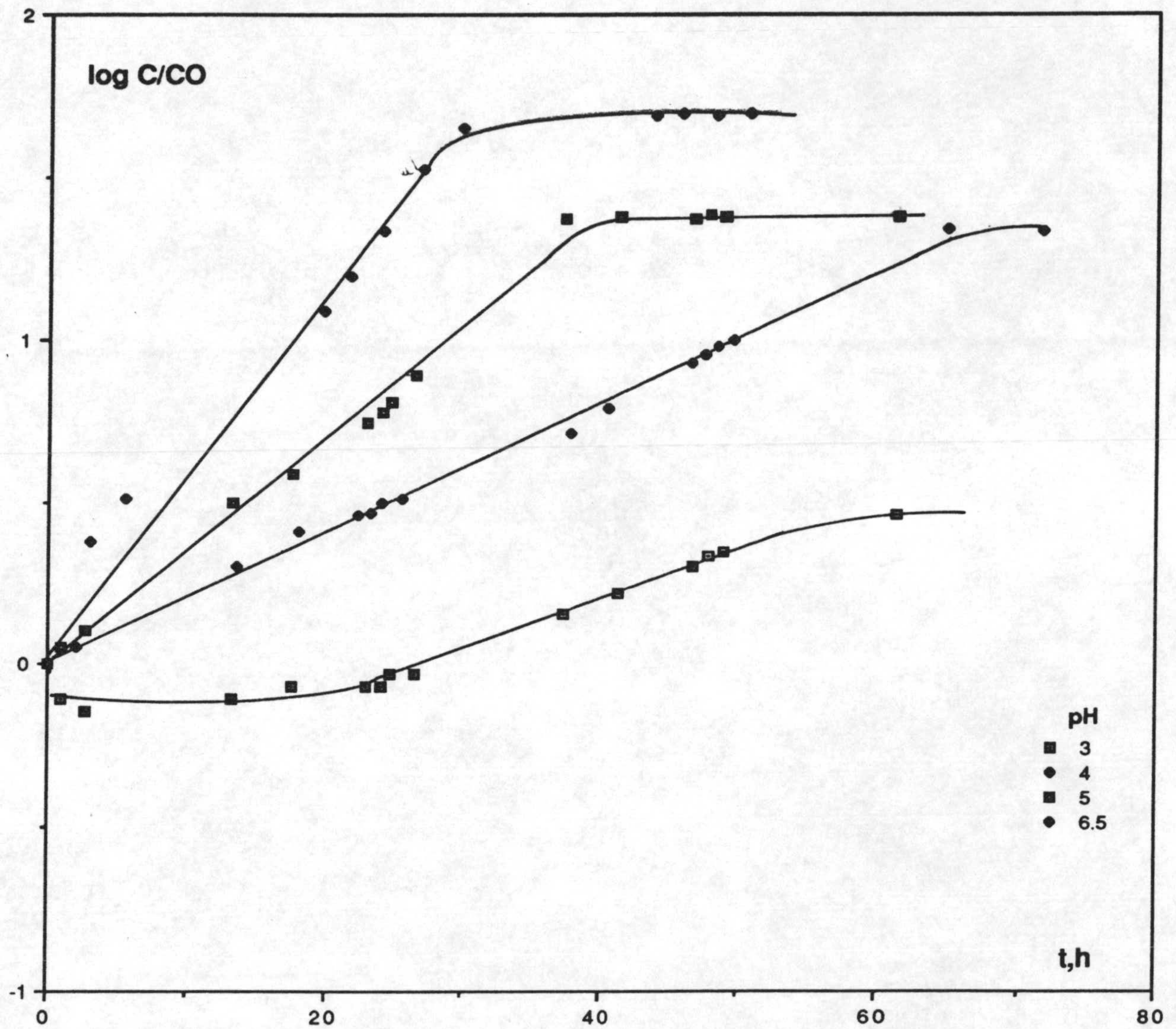


Fig 4.1

FOTOHETEROTROFICO  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$

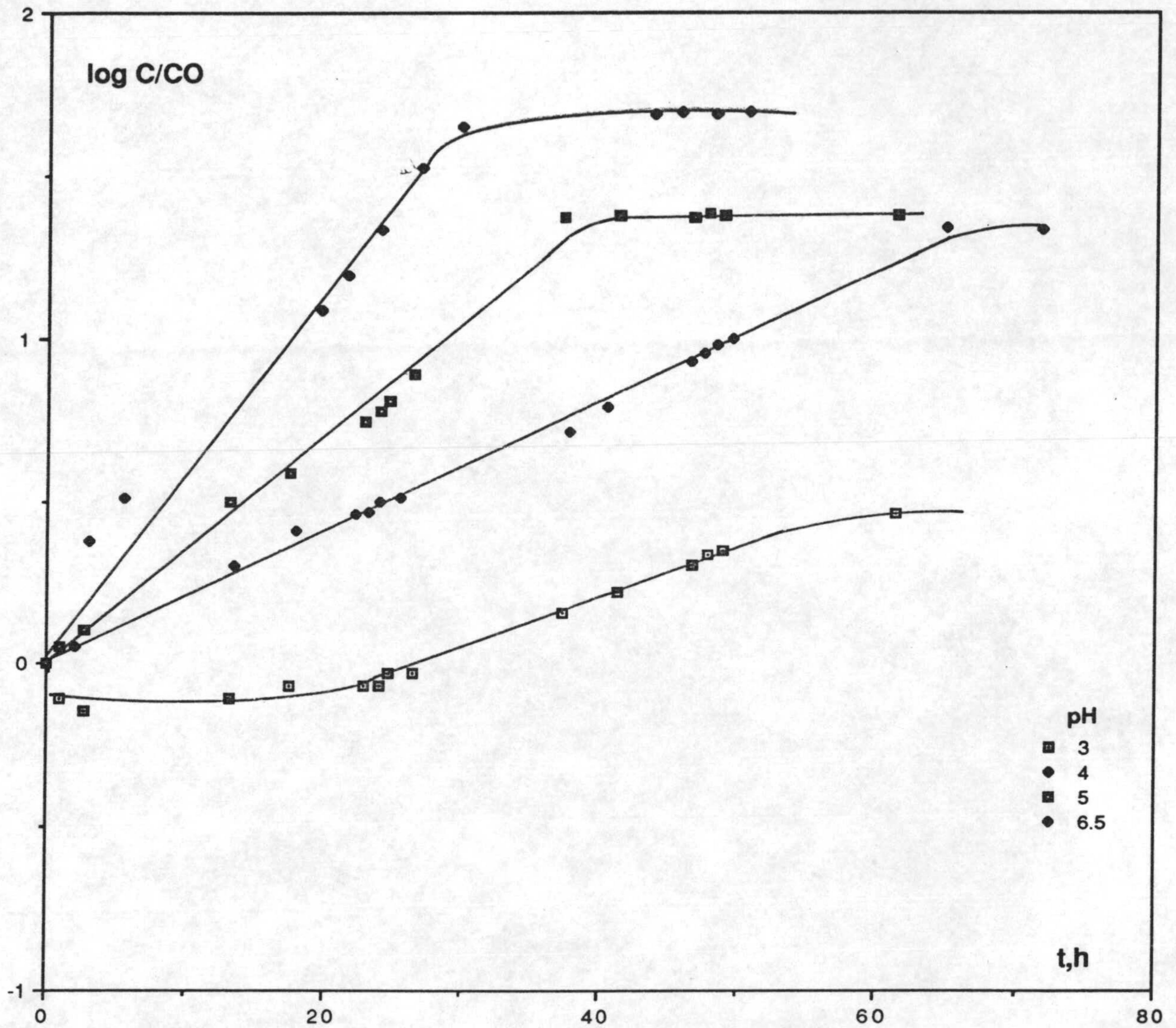


Fig 4.1

FOTOHETEROTROFICO  $S_o = 0.5 \text{ g/l}$

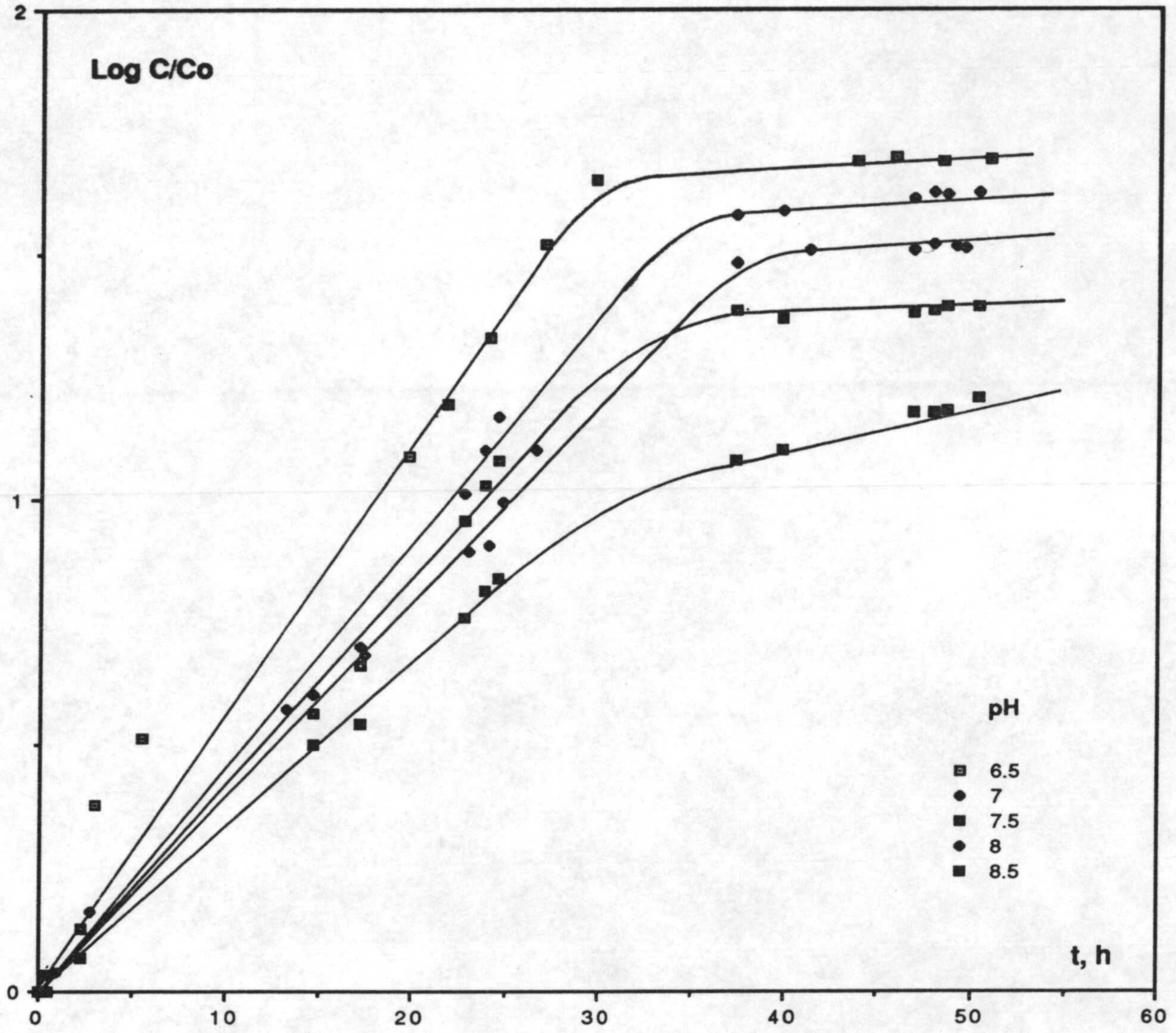


Fig 4.2



FOTOHETEROTROFICO  $S_o = 0.5 \text{ g/l}$

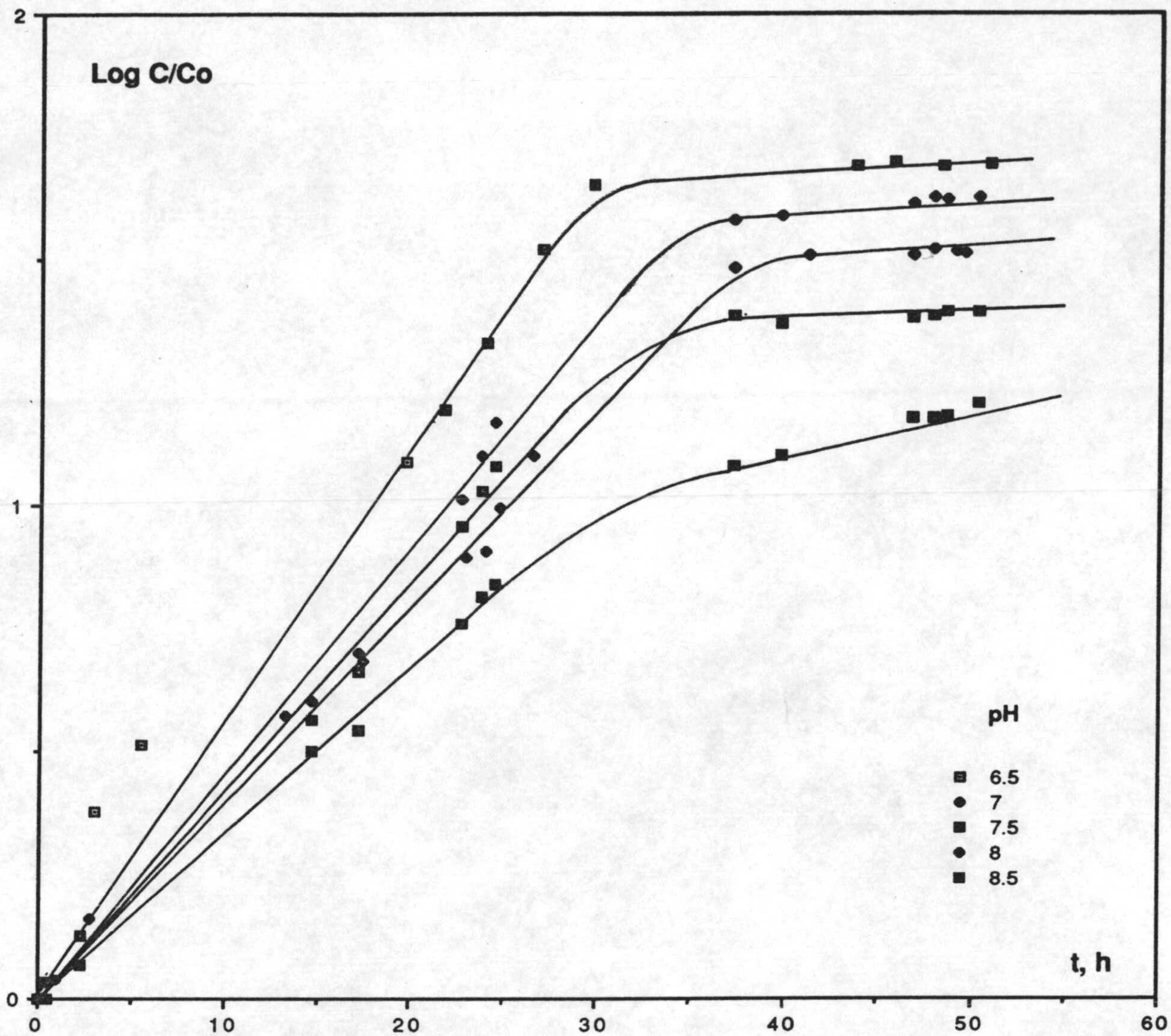


Fig 4.2

Fotoheterotrófico pH = 4

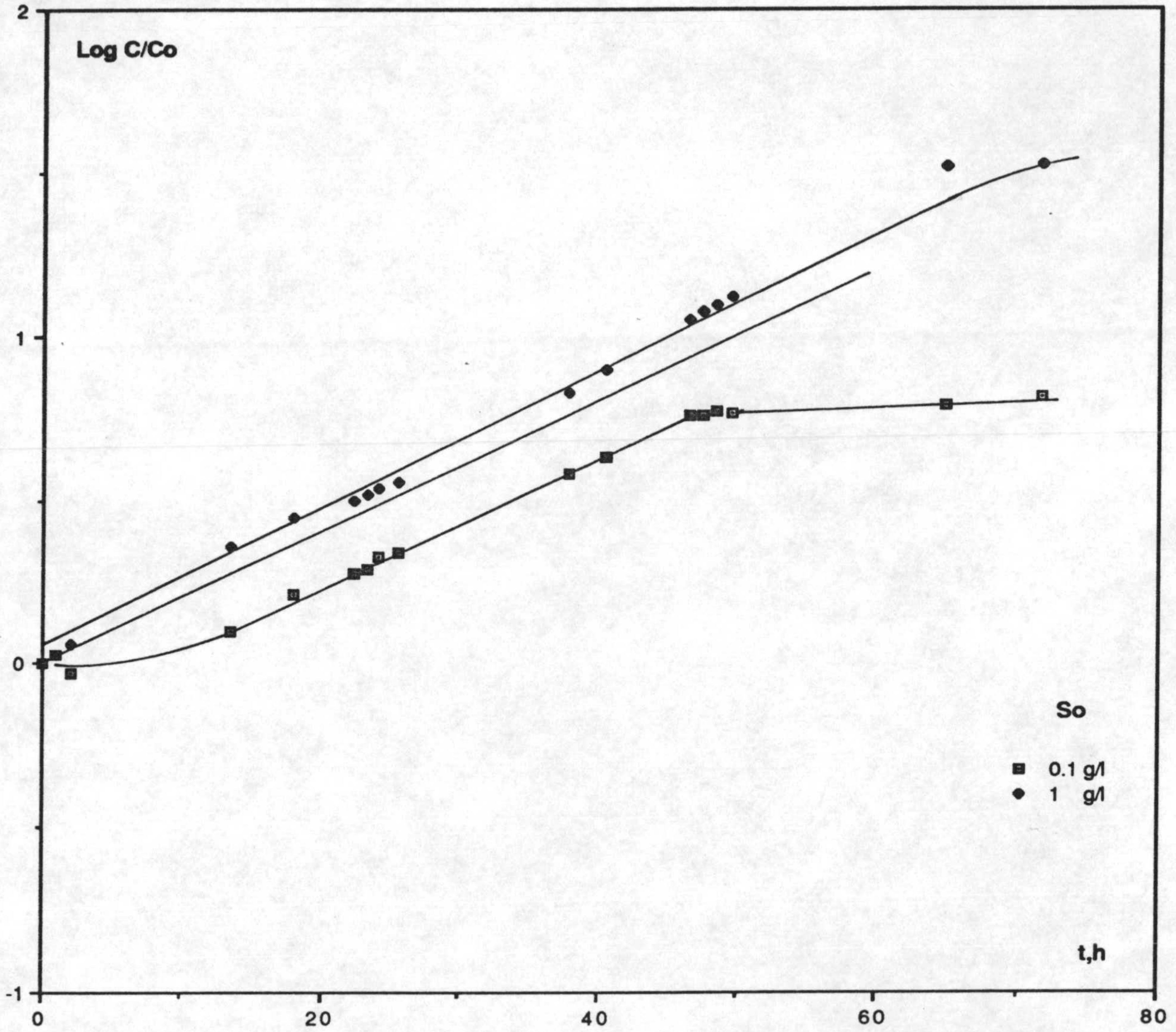


Fig. 4.3

Fotoheterotrófico pH = 4

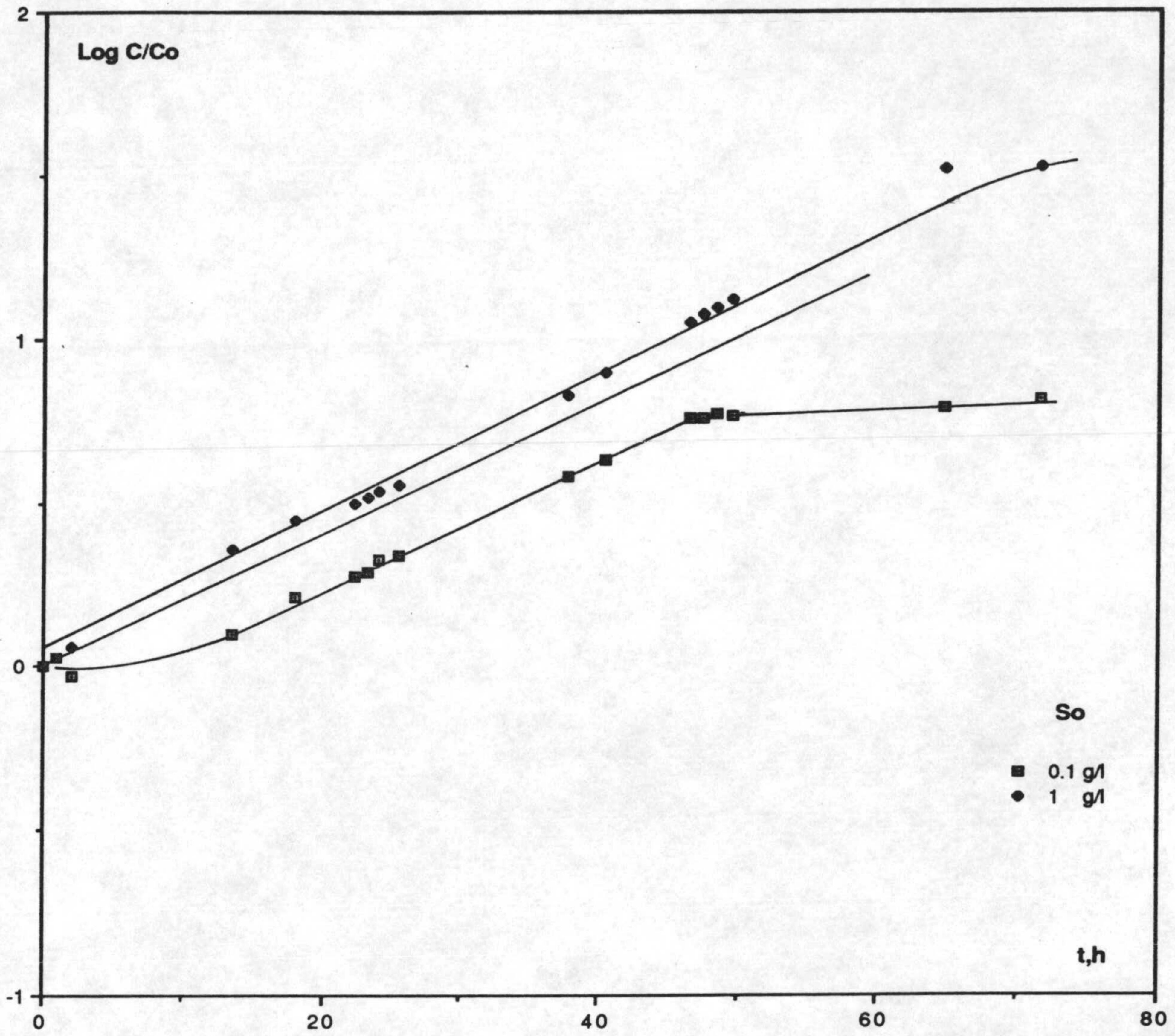


Fig. 4.3

Anaerobio pH = 4

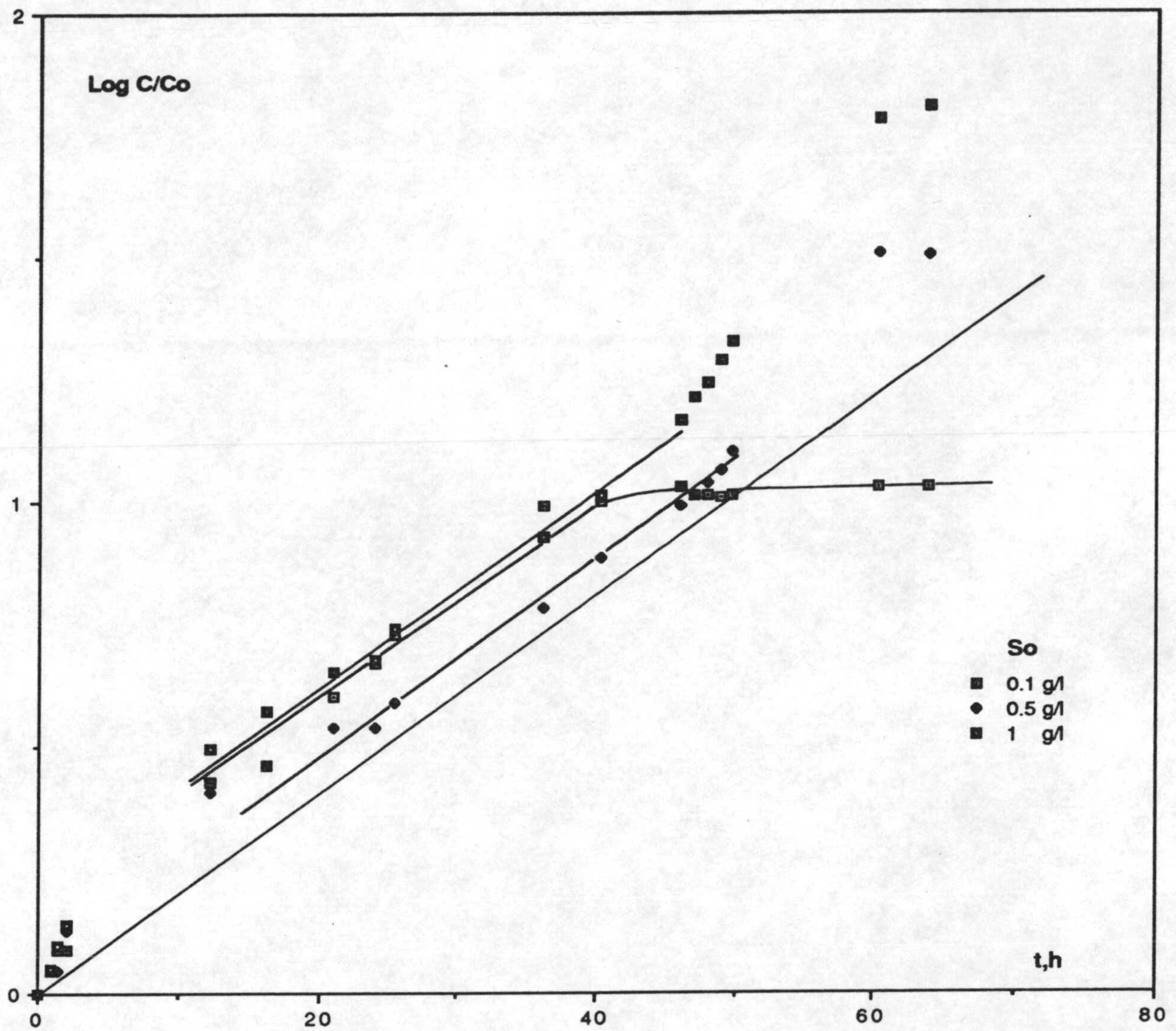


Fig 4.4

Anaerobio pH = 4

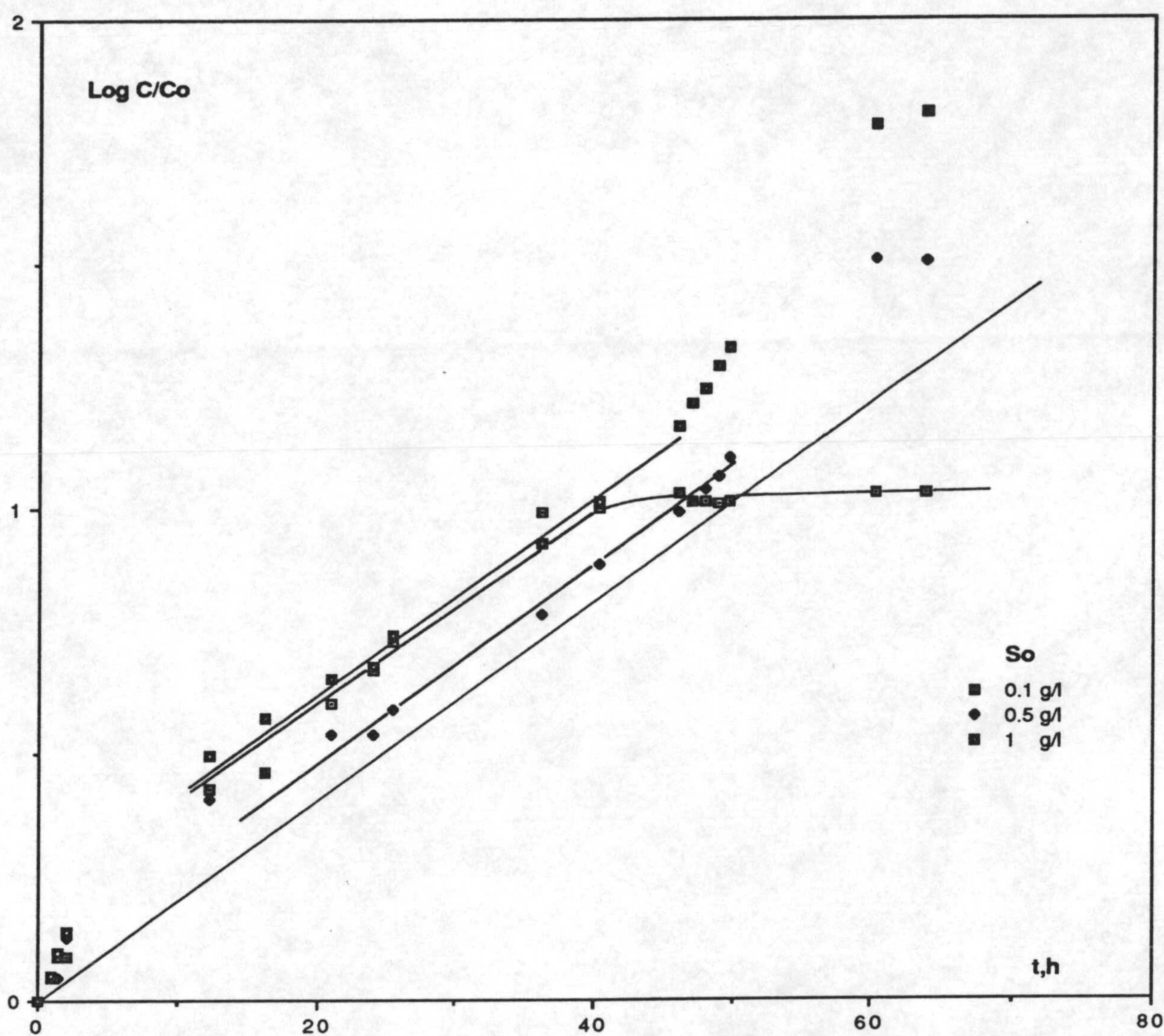


Fig 4.4

Mixotrófico,  $S_0=0.5$  g/L, pH = 5

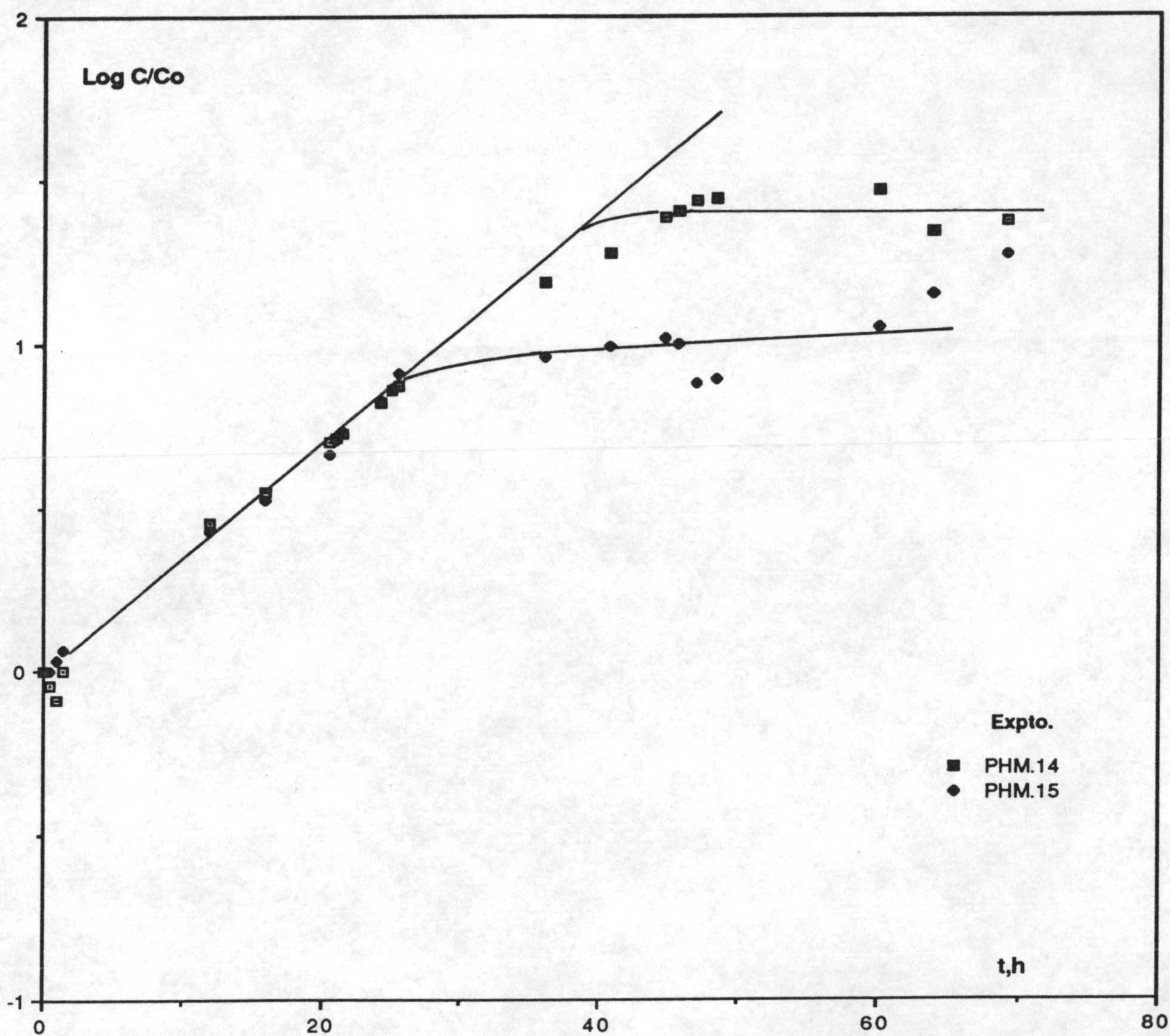


Fig 4.5

Mixotrófico,  $S_o=0.5$  g/L, pH = 5

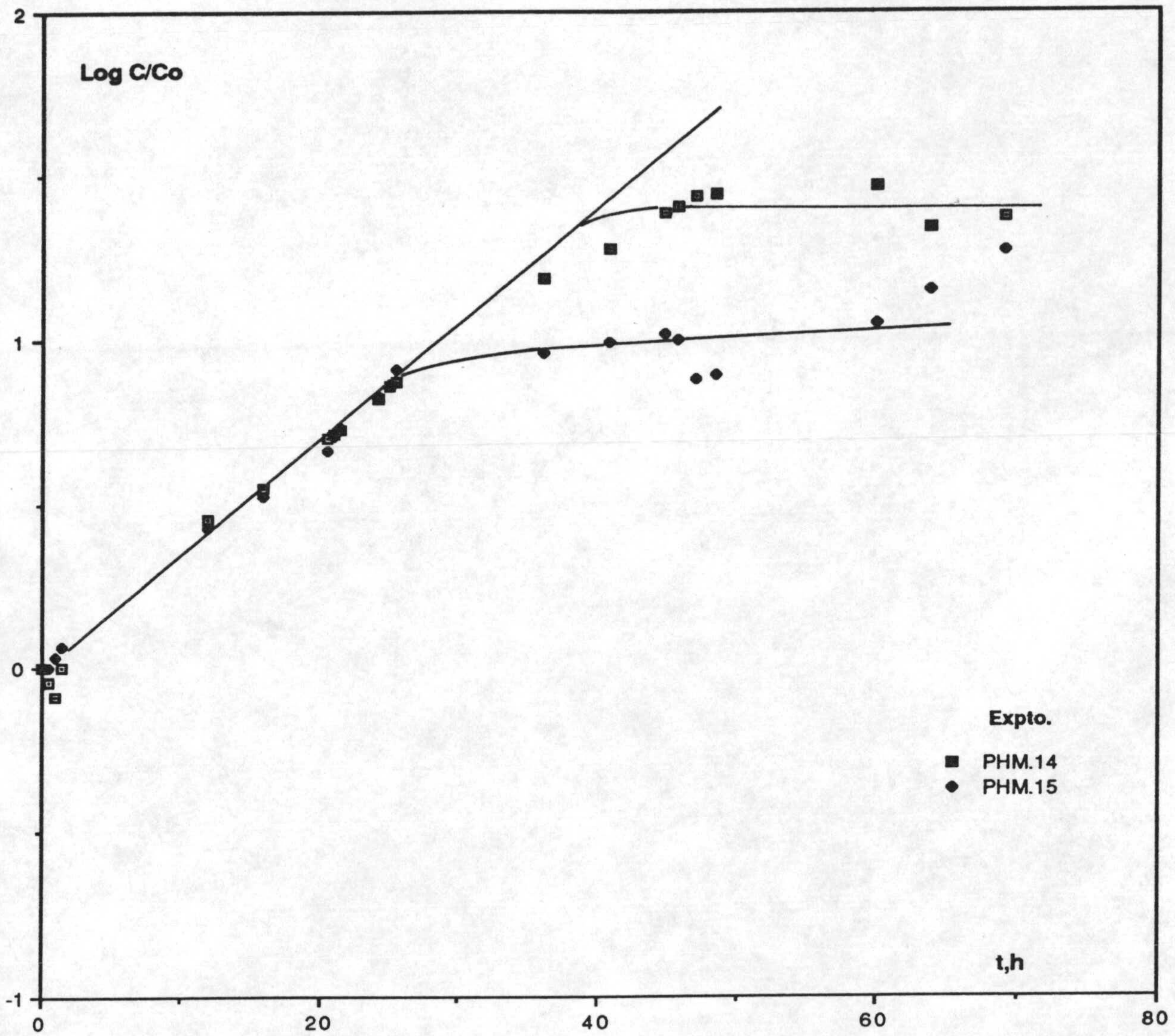


Fig 4.5

Mixotrófico,  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$ ,  $\text{pH} = 7.5$

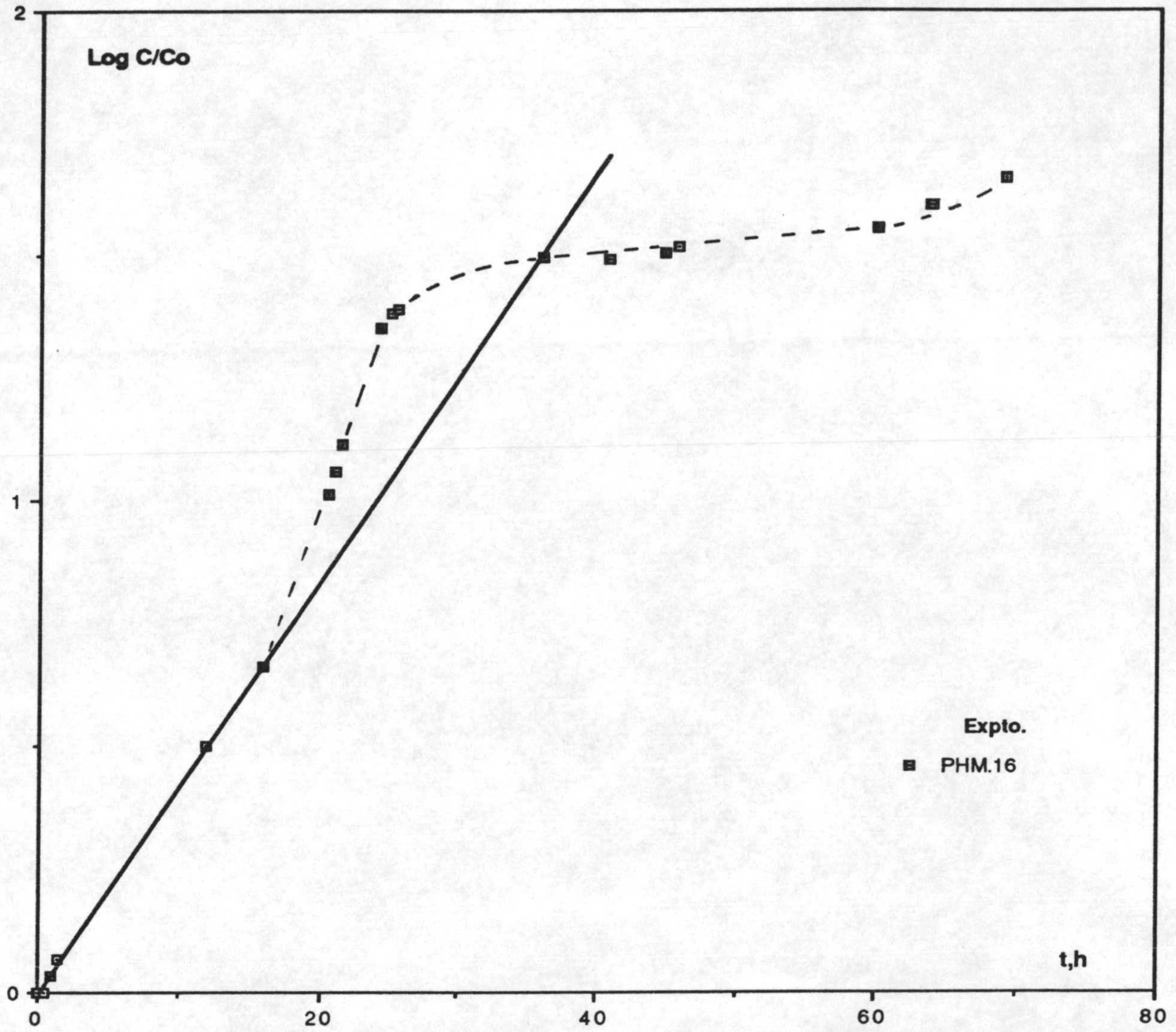


Fig 4.6



Mixotrófico,  $S_o = 0.5$  g/L, pH = 7.5

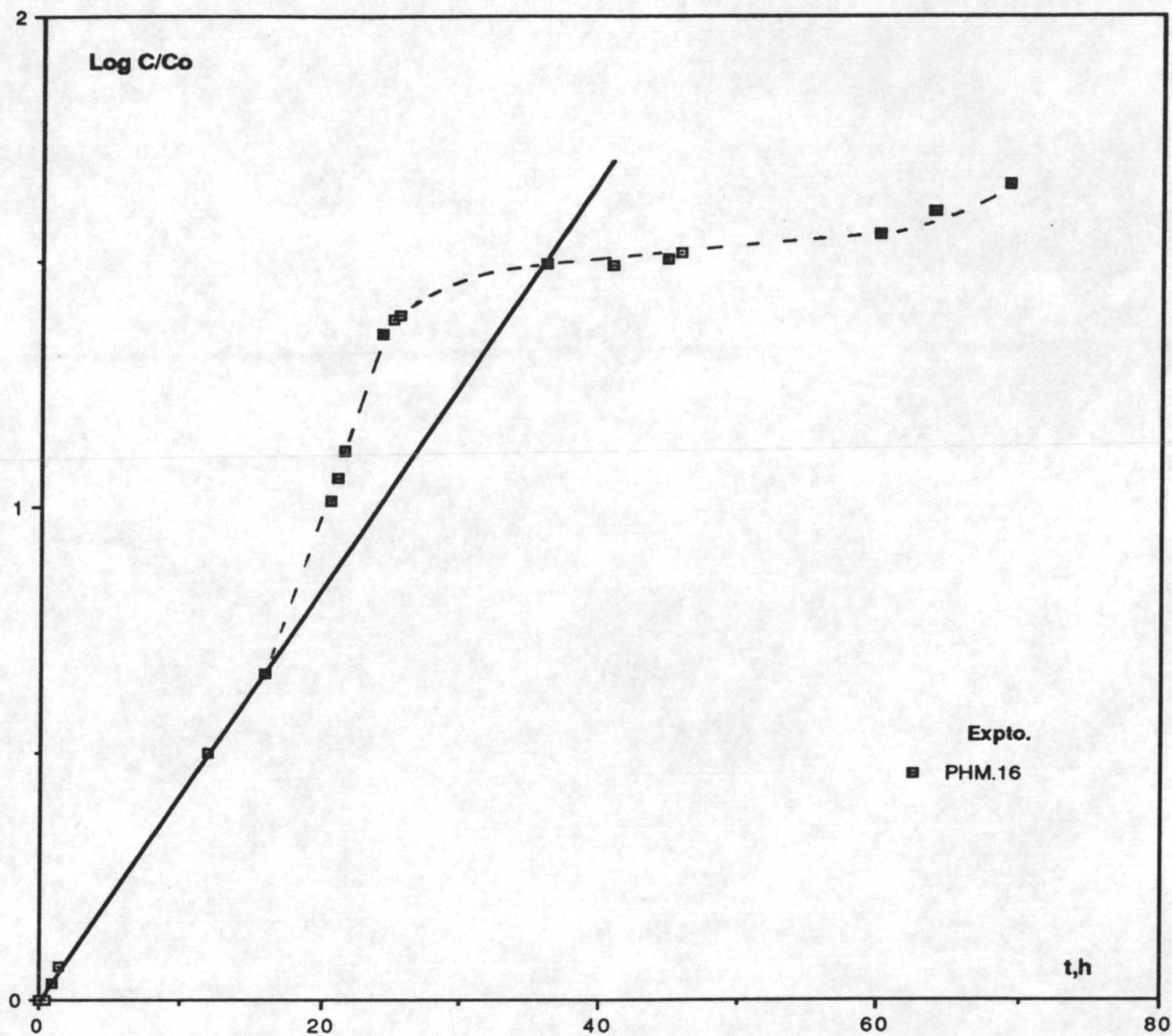


Fig 4.6

Mixotrófico,  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$

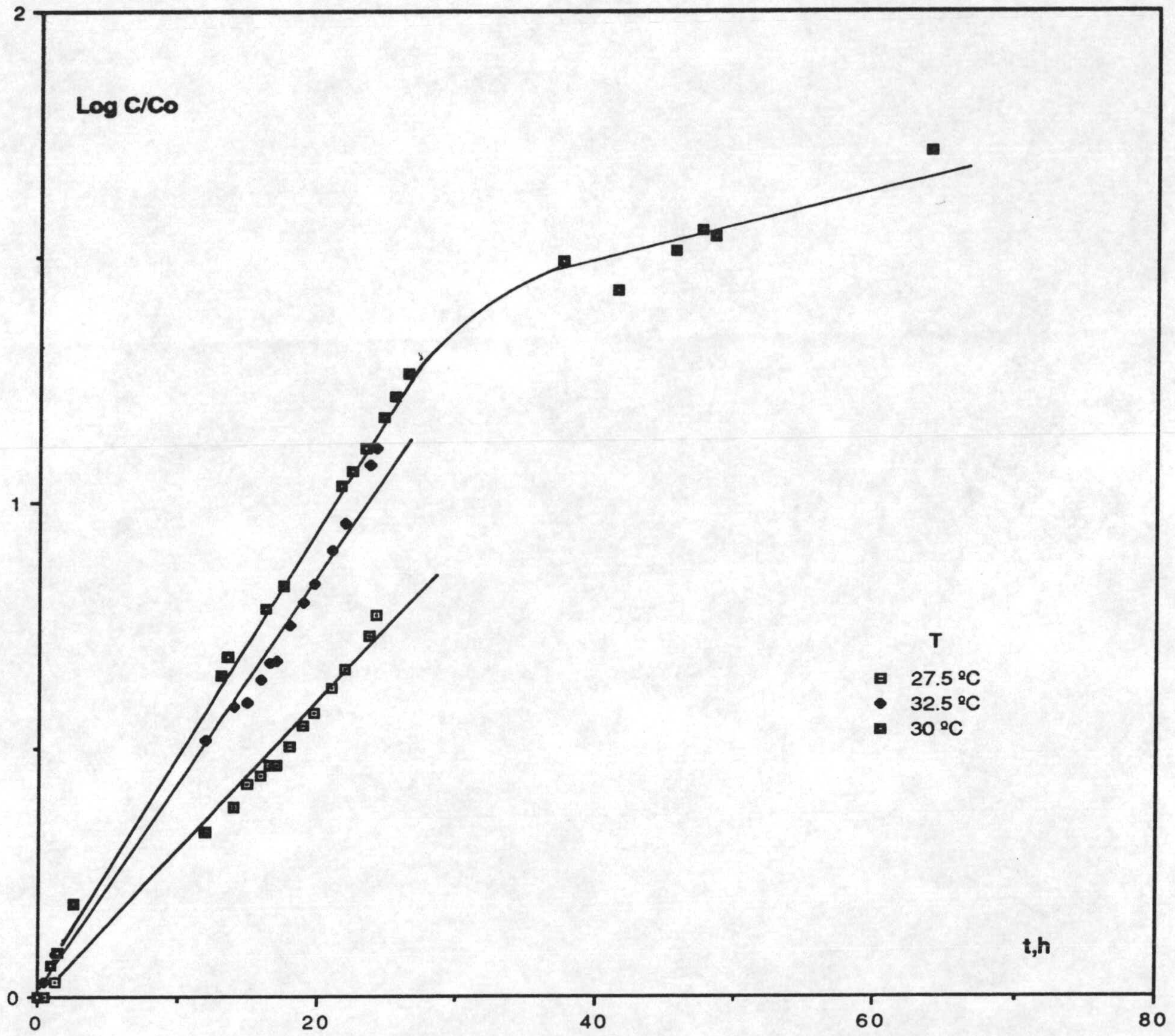


Fig 4.7

Mixotrófico,  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$

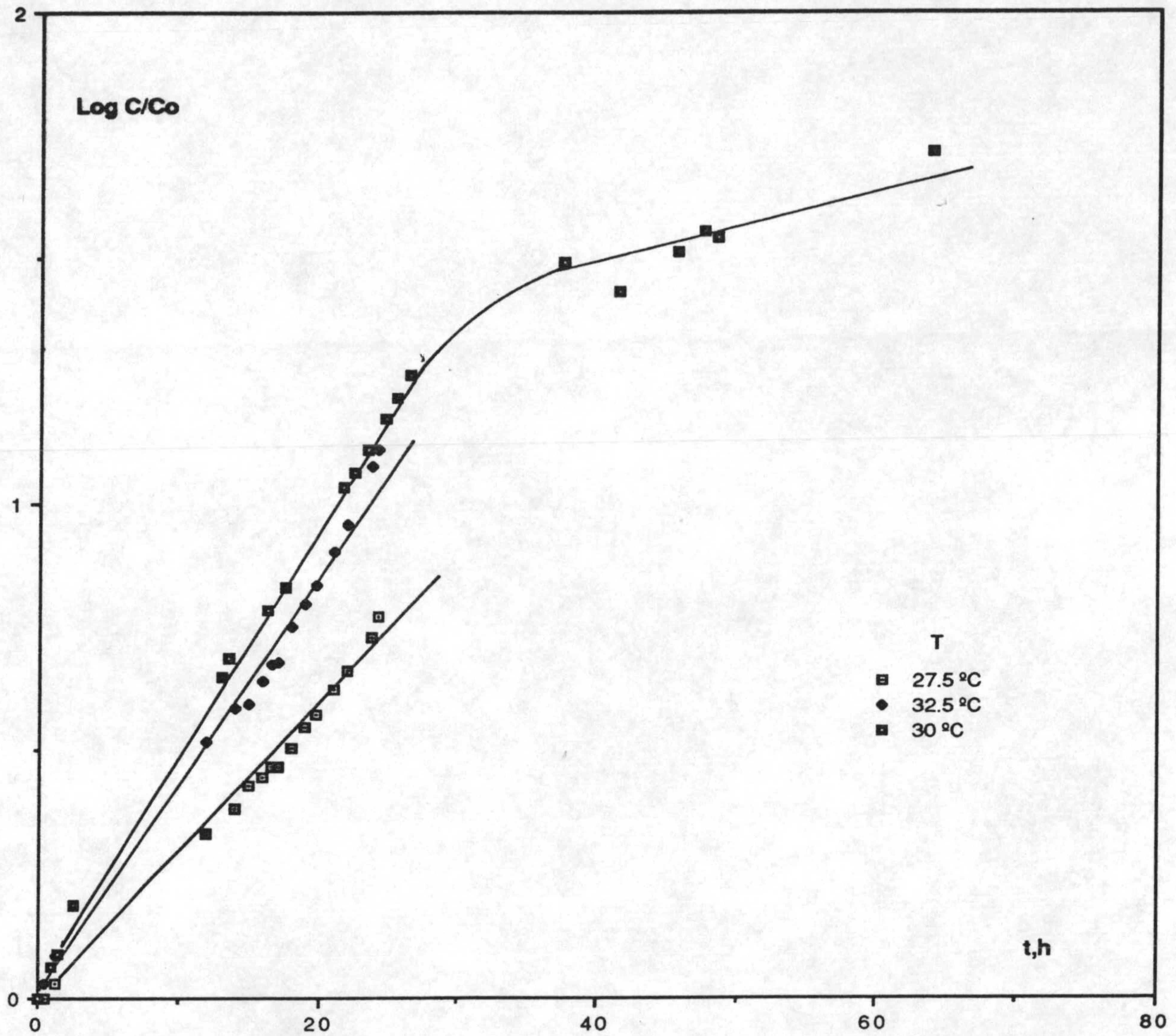


Fig 4.7

## **5 RESULTADOS EXPERIMENTALES**

5.1

Para el estudio experimental de los distintos tipos de crecimiento investigados, mixotrófico, fotoheterotrófico y anaerobio se realizaron distintas series de experimentos cuyos datos cinéticos se exponen a continuación en este apartado.

Los experimentos citados se realizaron a los valores de pH y temperatura seleccionados en el apartado anterior de pH=6.5 y T= 30°C , y se analizó la influencia de la concentración de sustrato orgánico, glucosa y de la intensidad inicial de iluminación.

### 5.1 CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Los experimentos de crecimiento mixotrófico se realizaron a tres niveles de concentración inicial de glucosa 0.1, 0.5 y 1 g/L y cuatro niveles de intensidad de iluminación inicial de, aproximadamente 2000, 1300, 800 y 400 lux.

En la siguiente tabla se esquematiza el plan de realización de los experimentos y el número de ensayos realizados para el estudio de los mismos:

I <sub>o</sub> , lux	GLUCOSA g/L			: Total ensayos
	: 0.1	: 0.5	: 1	
2000	: 4	: 4	: 4	: 12
1300	: 2	: 2	: 2	: 6
800	: 2	: 2	: 2	: 6
400	: 2	: 2	: 2	: 6
Total ensayos	: 10	: 10	: 10	: 30

Los datos cinéticos experimentales se indican en las Tablas 5.1 a 5.13 y en

la Tabla 4.8 .Para estos experimentos la letra de identificación M significa el tipo de crecimiento investigado y el número que la acompaña el orden de realización de los mismos. También se considera el experimento TM.5 de intensidad de iluminación máxima, 2000 lux y concentración de glucosa 0.5 g/L, cuyos datos experimentales se han indicando en la Tabla 4.8 .

De forma esquemática se incluye a continuación la tabla que describe la intensidad de iluminación por secciones dentro de los vasos de cultivo y la intensidad inicial global calculada en los mismos a partir de los valores anteriores tal como se describió en el apartado tres de esta Memoria.

### CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Intensidades medias de iluminación, lux

EXPTO.	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>0</sub>
M.1	2098	2026	1928	1897	2083	2027
M.2 M.3 M.4	2088	2011	1931	1898	2074	2020
M.5	1993	1913	1930	2011	2133	1991
M.6 M.7 TM.5	1977	1906	1925	2007	2122	1981
M.8	1914	1910	1846	1849	2087	1914
M.9 M.10 M.11	1895	1896	1848	1853	2073	1904
M.12 M.13	1379	1377	1366	1364	1472	1386
M.14 M.15	1365	1363	1359	1345	1443	1370
M.16 M.17	1250	1234	1244	1246	1324	1255
M.18 M.19	838	811	807	818	745	814
M.20 M.21	831	811	799	813	742	809
M.22 M.23	829	808	785	806	725	802
M.24	366	375	363	373	402	373
M.25	373	361	364	363	386	370
M.26	391	385	381	381	406	389
M.27	395	391	390	388	413	395
M.28	367	365	362	359	386	367
M.29	373	361	364	364	386	370

TABLA 5.1

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.1			Expto. M.2		
So= 0.1 g/L Io= 2027 lux			So= 0.1 g/L Io= 2020 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.012	1.000	0.00	0.012	1.000
1.50	0.018	1.500	1.00	0.014	1.167
2.50	0.020	1.667	1.50	0.015	1.250
3.50	0.022	1.833	2.50	0.017	1.417
4.50	0.025	2.083	13.00	0.053	4.417
5.00	0.025	2.083	13.50	0.055	4.583
7.50	0.037	3.083	16.33	0.077	6.417
8.50	0.042	3.500	17.50	0.081	6.750
9.50	0.047	3.917	21.75	0.126	10.500
10.50	0.053	4.417	22.50	0.129	10.750
12.50	0.066	5.500	23.50	0.092	7.667
25.50	0.080	6.667	24.75	0.097	8.083
26.50	0.089	7.417	25.50	0.100	8.333
27.50	0.091	7.583	26.50	0.107	8.917
28.50	0.102	8.500	37.50	0.211	17.583
31.50	0.125	10.417	41.50	0.273	22.750
32.50	0.139	11.583	45.50	0.335	27.917
33.50	0.148	12.333	47.50	0.353	29.417
34.50	0.148	12.333	48.50	0.368	30.667
48.25	0.374	31.167	63.75	0.595	49.583
50.50	0.412	34.333			
52.50	0.440	36.667			
56.00	0.490	40.833			
57.00	0.505	42.083			

TABLA 5.2

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.3

So= 0.1 g/L Io= 2020 lux

t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.010	1.000
0.50	0.011	1.100
1.25	0.013	1.300
12.50	0.039	3.900
16.00	0.050	5.000
21.25	0.079	7.900
22.50	0.091	9.100
23.25	0.094	9.400
24.00	0.096	9.600
25.00	0.098	9.800
36.50	0.132	13.200

Expto. M.4

So= 0.1 g/L Io= 2020 lux

t,h	C ,g/L	C/Co
.00	0.012	1.000
1.00	0.015	1.250
2.25	0.018	1.500
4.25	0.020	1.667
6.00	0.024	2.000
7.50	0.027	2.250
10.00	0.036	3.000
22.00	0.095	7.917
23.00	0.070	5.833
23.50	0.072	6.000
24.00	0.074	6.167
24.50	0.074	6.167
25.25	0.07g	6.583
26.25	0.086	7.167
28.25	0.097	8.083
34.00	0.139	11.583
46.25	0.280	23.333
47.50	0.296	24.667
48.50	0.317	26.417
50.00	0.355	29.583
52.25	0.400	33.333
57.50	0.512	42.667
70.50	0.772	64.333
71.75	0.831	69.250
73.00	0.843	70.250
73.50	0.815	67.917
74.25	0.833	69.417



TABLA 5.3

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.5

Expto. M.6

So= 0.5 g/L Io= 1991 lux

So= 0.5 g/L Io= 1981 lux

t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.009	1.000
1.50	0.021	1.400	0.50	0.012	1.333
2.50	0.023	1.533	1.25	0.014	1.556
3.50	0.023	1.533	12.50	0.044	4.889
4.50	0.028	1.867	16.00	0.057	6.333
5.00	0.029	1.933	21.25	0.101	11.222
7.50	0.041	2.733	22.50	0.115	12.778
8.50	0.048	3.200	23.25	0.122	13.556
9.50	0.054	3.600	24.00	0.137	15.222
10.50	0.062	4.133	25.00	0.150	16.667
12.50	0.095	6.333	36.50	0.245	27.222
25.50	0.152	10.133			
26.50	0.156	10.400			
27.50	0.151	10.067			
28.50	0.158	10.533			
31.50	0.175	11.667			
32.50	0.196	13.067			
33.50	0.206	13.733			
34.50	0.208	13.867			
48.25	0.426	28.400			
50.50	0.468	31.200			
52.50	0.493	32.867			
56.00	0.544	36.267			
57.00	0.563	37.533			

TABLA 5.4

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.7			Expto. M.8		
So= 0.5 g/L Io= 1981 lux			So= 1 g/L Io= 1914 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.015	1.000
1.00	0.017	1.133	1.50	0.018	1.200
2.25	0.020	1.333	2.50	0.020	1.333
4.25	0.024	1.600	3.50	0.020	1.333
6.00	0.026	1.733	4.50	0.024	1.600
7.50	0.031	2.067	5.00	0.024	1.600
10.00	0.038	2.533	7.50	0.039	2.600
22.00	0.099	6.600	8.50	0.042	2.800
23.00	0.110	7.333	9.50	0.053	3.533
23.50	0.118	7.867	10.50	0.058	3.867
24.00	0.128	8.533	12.50	0.075	5.000
24.50	0.131	8.733	25.50	0.344	22.933
25.25	0.145	9.667	26.50	0.344	22.933
26.25	0.168	11.200	27.50	0.228	15.200
28.25	0.212	14.133	28.50	0.242	16.133
34.00	0.331	22.067	31.50	0.245	16.333
46.25	0.377	25.133	32.50	0.263	17.533
47.50	0.396	26.400	33.50	0.270	18.000
48.50	0.414	27.600	34.50	0.284	18.933
50.00	0.427	28.467	48.25	0.439	29.267
52.25	0.461	30.733	50.50	0.461	30.733
57.50	0.590	39.333	52.50	0.461	30.733
70.50	0.911	60.733	56.00	0.493	32.867
71.75	0.907	60.467	57.00	0.507	33.800
73.00	0.953	63.533			
73.50	0.951	63.400			
74.25	0.960	64.000			

TABLA 5.5

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.9			Expto. M.10		
So= 1 g/L Io= 1904 lux			So= 1 g/L Io= 1904 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.011	1.000
1.00	0.017	1.133	0.50	0.013	1.182
1.50	0.018	1.200	1.25	0.015	1.364
2.50	0.020	1.333	12.50	0.044	4.000
13.00	0.062	4.133	16.00	0.058	5.273
13.50	0.066	4.400	21.25	0.099	9.000
16.33	0.082	5.467	22.50	0.113	10.273
17.50	0.093	6.200	23.25	0.123	11.182
21.75	0.150	10.000	24.00	0.136	12.364
22.50	0.164	10.933	25.00	0.154	14.000
23.50	0.201	13.400	36.50	0.392	35.636
24.75	0.279	18.600			
25.50	0.343	22.867			
26.50	0.452	30.133			
37.50	0.344	22.933			
41.50	0.472	31.467			
45-50	0.573	38.200			
47.50	0.597	39.800			
48.50	0.618	41.200			
63.75	0.843	56.200			

TABLA 5.6

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.11			Expto. M.12		
So= 1 g/L Io= 1904 lux			So= 0.1 g/L Io= 1386 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.012	1.000
1.00	0.016	1.067	3.75	0.022	1.833
2.25	0.019	1.267	5.00	0.023	1.917
4.25	0.024	1.600	6.00	0.026	2.167
6.00	0.027	1.800	7.00	0.028	2.333
7.50	0.031	2.067	20.00	0.071	5.917
10.00	0.038	2.533	21.50	0.080	6.667
22.00	0.109	7.267	22.50	0.087	7.250
23.00	0.123	8.200	24.00	0.096	8.000
23.50	0.131	8.733	27.50	0.123	10.250
24.00	0.139	9.267	28.50	0.123	10.250
24.50	0.146	9.733	29.50	0.131	10.917
25.25	0.160	10.667	30.50	0.129	10.750
26.25	0.185	12.333	45.00	0.226	18.833
28.25	0.233	15.533	46.50	0.240	20.000
34.00	0.498	33.200	47.50	0.246	20.500
46.25	0.474	31.600	51.00	0.282	23.500
47.50	0.486	32.400			
48.50	0.498	33.200			
50.00	0.525	35.000			
52.25	0.572	38.133			
57.50	0.663	44.200			
70.50	0.951	63.400			
71.75	0.962	64.133			
73.00	0.980	65.333			
73.50	1.039	69.267			
74.25	1.058	70.533			

TABLA 5.7

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.13			Expto. M.14		
So= 0.1 g/L    Io= 1386 lux			So= 0.5 g/L    Io= 1370 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.014	1.000	0.00	0.015	1.000
1.00	0.015	1.071	3.75	0.022	1.467
2.00	0.018	1.286	5.00	0.023	1.533
2.50	0.018	1.286	6.00	0.026	1.733
3.00	0.019	1.357	7.00	0.028	1.867
14.00	0.066	4.714	20.00	0.077	5.133
17.25	0.090	6.429	21.50	0.085	5.667
20.25	0.117	8.357	22.50	0.094	6.267
22.50	0.119	8.500	24.00	0.101	6.733
23.50	0.082	5.857	27.50	0.141	9.400
24.00	0.085	6.071	28.50	0.155	10.333
24.50	0.087	6.214	29.50	0.170	11.333
25.00	0.090	6.429	30.50	0.181	12.067
25.50	0.092	6.571	45.00	0.344	22.933
26.00	0.095	6.786	46.50	0.361	24.067
26.50	0.097	6.929	47.50	0.365	24.333
27.00	0.098	7.000	51.00	0.400	26.667
38.00	0.186	13.286			
41.25	0.221	15.786			
46.50	0.302	21.571			
47.00	0.284	20.286			
48.00	0.312	22.286			
49.00	0.312	22.286			
50.00	0.321	22.929			
51.00	0.423	30.214			
62.00	0.453	32.357			
66.00	0.490	35.000			

TABLA 5.8

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.15			Expto. M.16		
So= 0.5 g/L Io= 1370 lux			So= 1 g/L Io= 1255 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.022	1.000
1.00	0.015	1.000	3.75	0.024	1.091
2.00	0.018	1.200	5.00	0.027	1.227
2.50	0.020	1.333	6.00	0.028	1.273
3.00	0.022	1.467	7.00	0.031	1.409
14.00	0.067	4.467	20.00	0.080	3.636
17.25	0.094	6.267	21.50	0.090	4.091
20.25	0.126	8.400	22.50	0.096	4.364
22.50	0.182	12.133	24.00	0.106	4.818
23.50	0.215	14.333	27.50	0.154	7.000
24.00	0.233	15.533	28.50	0.177	8.045
24.50	0.247	16.467	29.50	0.222	10.091
25.00	0.275	18.333	30.50	0.302	13.727
25.50	0.292	19.467	45.00	0.417	18.955
26.00	0.301	20.067	46.50	0.461	20.955
26.50	0.299	19.933	47.50	0.467	21.227
27.00	0.201	13.400	51.00	0.525	23.864
38.00	0.284	18.933			
41.25	0.341	22.733			
46.50	0.404	26.933			
47.00	0.400	26.667			
48.00	0.427	28.467			
49.00	0.443	29.533			
50.00	0.455	30.333			
51.00	0.457	30.467			
62.00	0.578	38.533			
66.00	0.606	40.400			

TABLA 5.11

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.24			Expto. M.25		
So= 0.1 g/L Io= 373 lux			So= 0.1 g/L Io= 370 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.011	1.000	0.00	0.014	1.000
2.50	0.018	1.636	1.00	0.016	1.143
4.50	0.022	2.000	2.00	0.018	1.286
7.50	0.026	2.364	2.50	0.020	1.429
8.50	0.033	3.000	4.50	0.023	1.643
9.50	0.035	3.182	7.00	0.031	2.214
10.50	0.037	3.364	10.00	0.038	2.714
23.50	0.071	6.455	21.25	0.073	5.214
24.50	0.069	6.273	22.00	0.072	5.143
26.75	0.063	5.727	22.75	0.073	5.214
29.00	0.064	5.818	26.00	0.050	3.571
32.00	0.069	6.273	26.50	0.051	3.643
33.00	0.069	6.273	28.25	0.051	3.643
34.50	0.068	6.182	31.00	0.053	3.786
47.50	0.079	7.182	34.00	0.057	4.071
48.50	0.077	7.000	46.50	0.078	5.571
50.00	0.082	7.455	47.00	0.080	5.714
51.25	0.083	7.545	48.00	0.082	5.857
52.50	0.090	8.182	49.00	0.084	6.000
			50.00	0.086	6.143
			50.75	0.088	6.286
			52.81	0.089	6.357
			55.00	0.093	6.643
			58.00	0.098	7.000
			70.50	0.115	8.214
			71.75	0.119	8.500
			73.00	0.121	8.643
			74.00	0.123	8.786
			74.50	0.123	8.786

TABLA 5.12

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.26			Expto. M.27		
So= 0.5 g/L Io= 389 lux			So= 0.5 g/L Io= 395 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.014	1.000
2.50	0.022	1.467	1.00	0.017	1.214
4.50	0.026	1.733	2.00	0.019	1.357
7.50	0.034	2.267	2.50	0.021	1.500
8.50	0.041	2.733	4.50	0.025	1.786
9.50	0.044	2.933	7.00	0.031	2.214
10.50	0.048	3.200	10.00	0.039	2.786
23.50	0.168	11.200	21.25	0.112	8.000
24.50	0.166	11.067	22.00	0.122	8.714
26.75	0.163	10.867	22.75	0.133	9.500
29.00	0.163	10.867	26.00	0.237	16.929
32.00	0.161	10.733	26.50	0.265	18.929
33.00	0.161	10.733	28.25	0.252	18.000
34.50	0.160	10.667	31.00	0.232	16.571
47.50	0.174	11.600	34.00	0.225	16.071
48.50	0.173	11.533	46.50	0.165	11.786
50.00	0.176	11.733	47.00	0.164	11.714
51.25	0.179	11.933	48.00	0.168	12.000
52.50	0.183	12.200	49.00	0.170	12.143
			50.00	0.170	12.143
			50.75	0.172	12.286
			52.81	0.174	12.429
			55.00	0.179	12.786
			58.00	0.185	13.214
			70.50	0.205	14.643
			71.75	0.206	14.714
			73.00	0.207	14.786
			74.00	0.209	14.929
			74.50	0.208	14.857



TABLA 5.13

CINETICA DEL CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. M.28			Expto. M.29		
So= 1 g/L    Io= 367 lux			So= 1 g/L    Io= 370 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.015	1.000
2.50	0.023	1.533	1.00	0.017	1.133
4.50	0.026	1.733	2.00	0.020	1.333
7.50	0.038	2.533	2.50	0.023	1.533
8.50	0.043	2.867	4.50	0.025	1.667
9.50	0.052	3.467	7.00	0.033	2.200
10.50	0.061	4.067	10.00	0.046	3.067
23.50	0.317	21.133	21.25	0.133	8.867
24.50	0.314	20.933	22.00	0.147	9.800
26.75	0.303	20.200	22.75	0.172	11.467
29.00	0.299	19.933	26.00	0.314	20.933
32.00	0.297	19.800	26.50	0.365	24.333
33.00	0.297	19.800	28.25	0.467	31.133
34.50	0.292	19.467	31.00	0.452	30.133
47.50	0.296	19.733	34.00	0.401	26.733
48.50	0.292	19.467	46.50	0.262	17.467
50.00	0.287	19.133	47.00	0.262	17.467
51.25	0.290	19.333	48.00	0.264	17.600
52.50	0.290	19.333	49.00	0.268	17.867
			50.00	0.268	17.867
			50.75	0.270	18.000
			52.81	0.271	18.067
			55.00	0.273	18.200
			58.00	0.276	18.400
			70.50	0.291	19.400
			71.75	0.290	19.333
			73.00	0.289	19.267
			74.00	0.286	19.067
			74.50	0.284	18.933

De todos los experimentos realizados se han seleccionado para su representación gráfica tres a cada nivel de intensidad de iluminación, correspondiendo cada uno de ellos a una concentración inicial de glucosa distinta.

Estos datos cinéticos experimentales concentración adimensional de biomasa-tiempo se han representado en coordenadas semilogarítmicas en las Figuras 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4, correspondiendo cada una de ellas a un nivel de intensidad de iluminación diferente.

Puede observarse en estas curvas de crecimiento tres zonas diferenciadas; una primera zona de crecimiento exponencial que corresponde al crecimiento mixotrófico propiamente dicho, una zona estacionaria de transición desde que se consume el sustrato orgánico hasta que comienza la tercera zona que corresponde a un crecimiento exponencial autotrófico.

La zona estacionaria es de duración variable según los experimentos, mayor cuanto menor es la intensidad de iluminación. Al final de todos los experimentos se observa ya el inicio de una zona de crecimiento lineal determinada por la existencia de una limitación por la luz.

Las distintas características de extinción de las células del alga en los períodos mixotrófico y autotrófico (tamaño, contenido en clorofila...) hacen necesario el uso de dos factores de conversión distintos para transformar los valores de absorbancia de la suspensión en concentración celular. Este hecho origina en algunos experimentos un descenso de la misma al cambiar de factor de conversión.

De la observación de estas gráficas y como lo confirman los valores de las pendientes de la primera zona exponencial, indicados en la siguiente tabla, no existe influencia sobre el crecimiento mixotrófico de la concentración inicial de glucosa ni de la intensidad de iluminación inicial en el margen de variación de estas magnitudes investigado.

MIXOTROFICO

$I_0 = 2000 \text{ lux}$

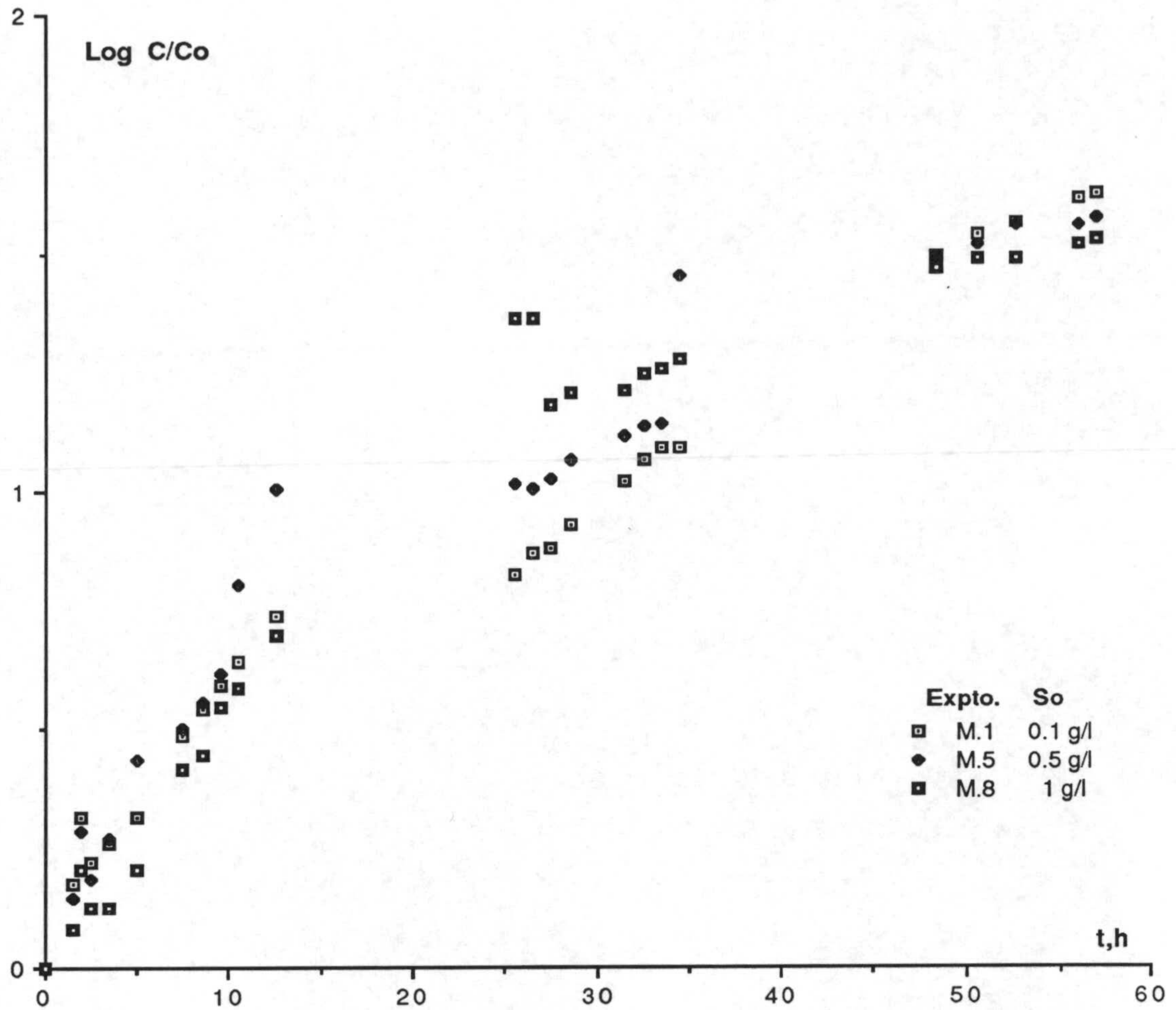


Fig 5.1

MIXOTROFICO

$I_0 = 1300 \text{ lux}$

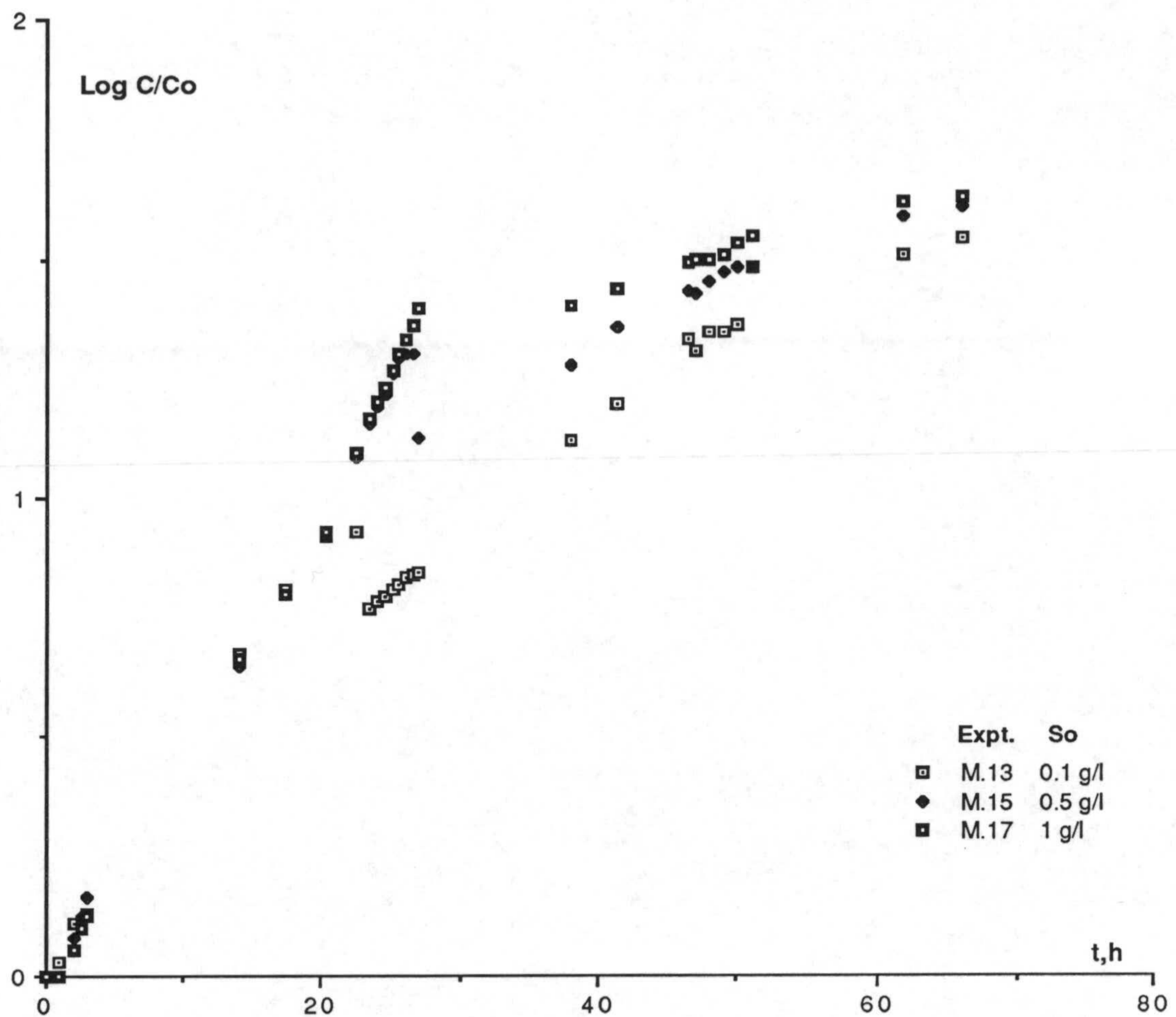


Fig 5.2

MIXOTROFICO

$I_0 = 814 \text{ lux}$

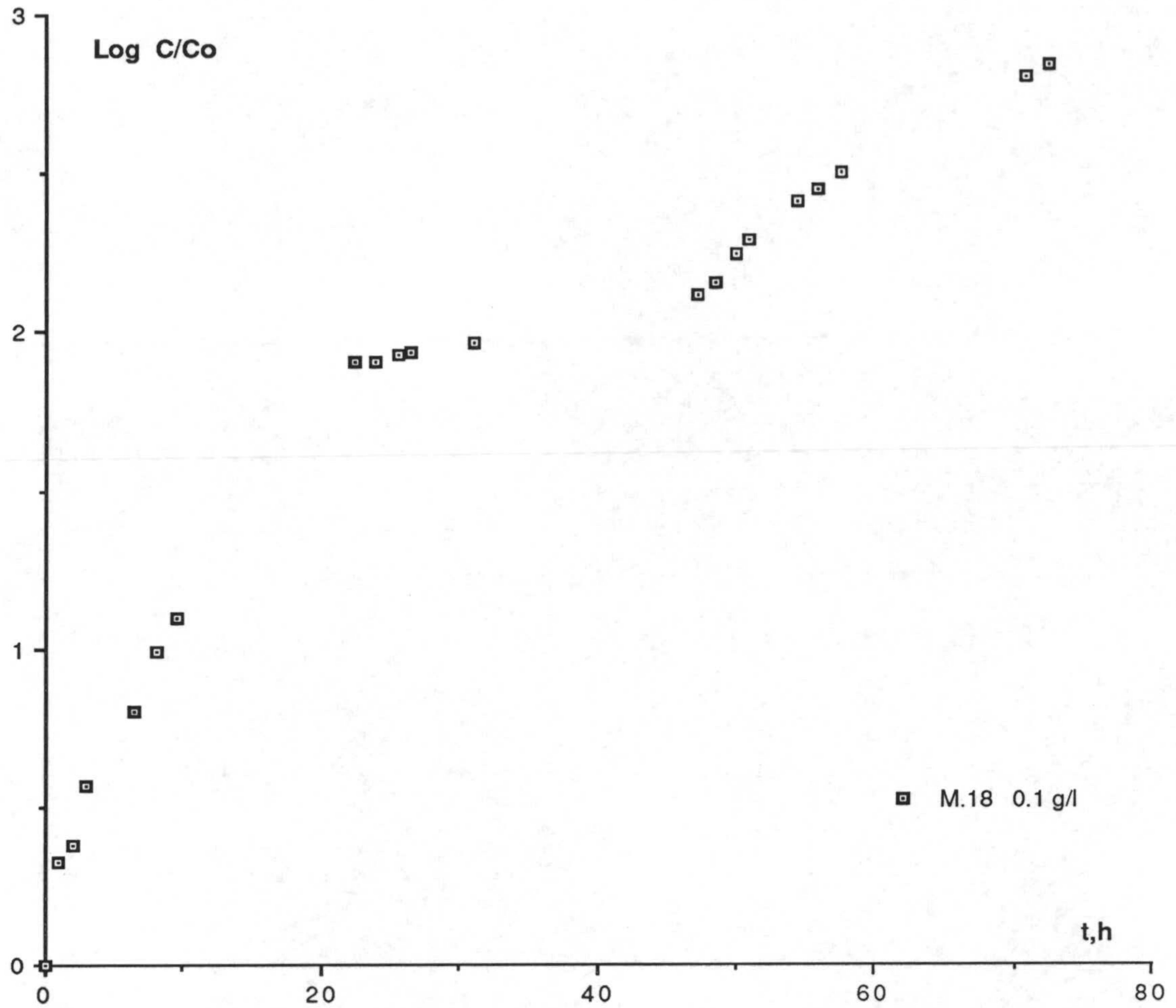


Fig 5.3

MIXOTROFICO

$I_0 = 400 \text{ lux}$

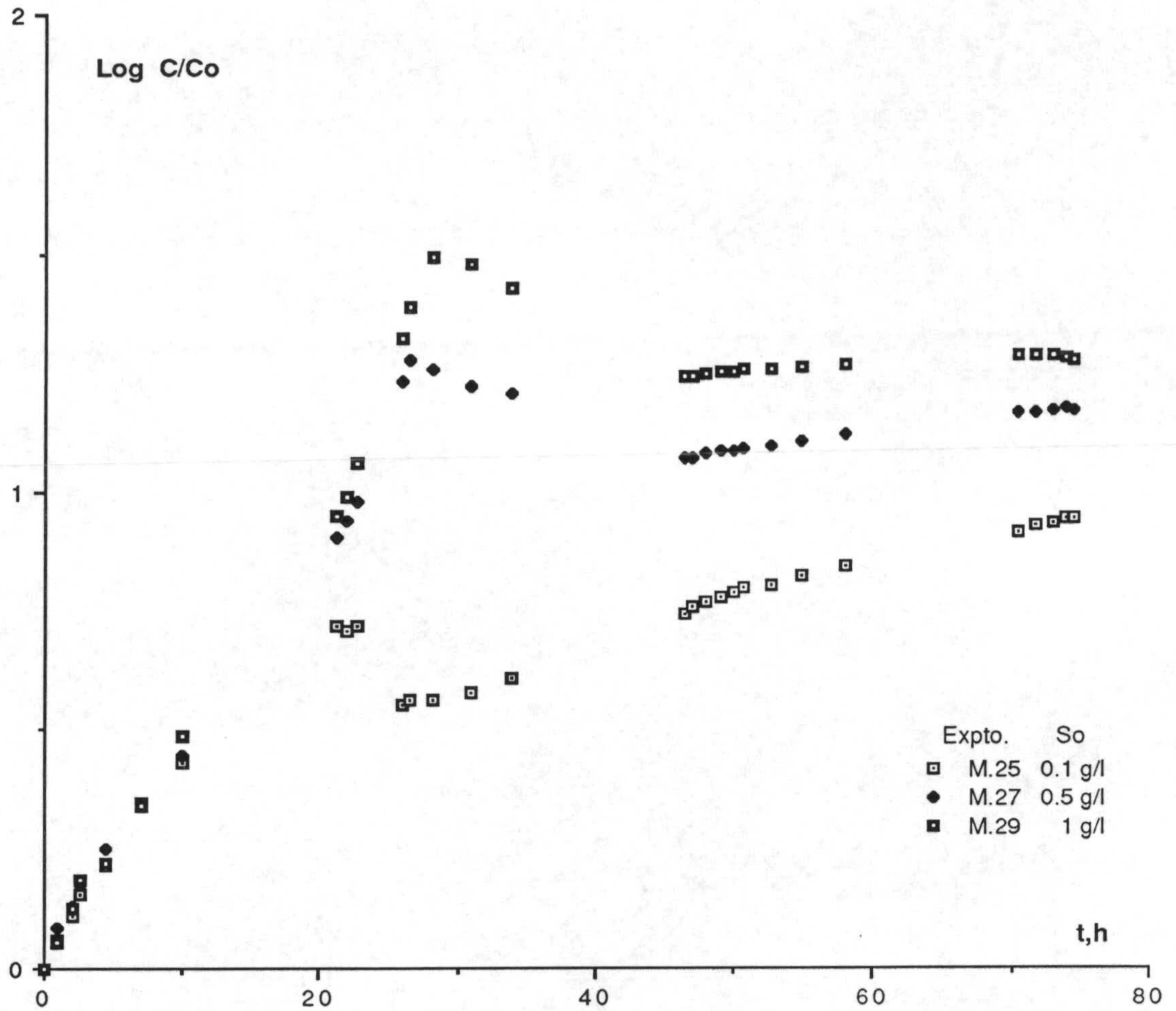


Fig 5.4

<u>Expto.</u>	<u>Io,lux</u>	<u>So,g/L</u>	<u>Pendiente</u>
M.1	2027	0.1	0.0562
M.5	1991	0.5	0.0562
M.8	1914	1	0.0534
M.13	1386	0.1	0.0466
M.15	1370	0.5	0.0495
M.17	1255	1	0.0518
M.18	814	0.1	0.0451
M.20	809	0.5	0.0456
M.22	802	1	0.0548
M.25	370	0.1	0.0433
M.27	400	0.5	0.0439
M.29	370	1	0.0492

La variación de las pendientes de la zona exponencial autotrófica es evidente y esta claramente influenciada por el valor de la intensidad de iluminación existente en el cultivo al comienzo de este periodo.

## 5.2 CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Los experimentos de crecimiento fotoheterotrófico se realizaron a tres niveles de concentración inicial de glucosa 0.1, 0.5 y 1 g/L y a tres niveles de intensidad inicial de iluminación de aproximadamente 2000, 1400 y 400 lux.

El plan de realización de los ensayos se esquematiza a continuación indicándose el número de ellos, encuadrados según las condiciones expresadas en el párrafo anterior.

		GLUCOSA g/L				
I, lux:	0.1	:	0.5	:	1	: Total ensayos
2000	: 8		2	:	2	: 12
1400	: 1	:	1	:	1	: 3
400	: 6	:	1	:	3	: 10
Total ensayos:	15	:	4	:	6	: 25

Se realizó un mayor número de experimentos a la concentración de glucosa de 0.1 g/L para comprobar la existencia o no de limitación por sustrato, hecho ya expuesto, que ocurre en crecimiento heterotrófico a esta concentración inicial.

Los datos cinéticos experimentales se indican en las Tablas 5.14 a 5.19 y en la Tabla 4.1.

Para estos experimentos la letra de identificación es la F seguida de un número de orden. Se considera también el experimento PHF.4 de intensidad de iluminación 1955 lux y concentración de glucosa 0.5 g/L que ya se recogió en la Tabla 4.1.

Se incluye a continuación un cuadro con las intensidades de iluminación por secciones dentro de los vasos de cultivo y los valores de la intensidad global inicial.



TABLA 5.14

CINETICA DEL CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. F.1			Expto. F.2		
So= 0.1 g/L Io= 1963 lux			So= 0.1 g/L Io= 1963 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.50	0.012	1.000	0.00	0.008	1.000
2.25	0.014	1.167	3.00	0.017	2.125
5.25	0.024	2.000	5.50	0.025	3.125
7.25	0.026	2.167	19.75	0.087	10.875
9.50	0.032	2.667	21.75	0.109	13.625
22.25	0.100	8.333	24.00	0.121	15.125
24.75	0.102	8.500	27.00	0.140	17.500
27.25	0.120	10.000	29.75	0.147	18.375
29.50	0.131	10.917	43.75	0.166	20.750
31.25	0.118	9.833	45.75	0.171	21.375
33.00	0.115	9.583	48.25	0.187	23.375
46.00	0.104	8.667	50.75	0.187	23.375
49.50	0.108	9.000			

Expto. F.3			Expto. F.4		
So= 0.1 g/L Io= 1963 lux			So= 0.1 g/L Io= 1963 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C, g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.012	1.000
1.00	0.015	1.000	1.00	0.015	1.250
2.00	0.016	1.067	2.00	0.018	1.500
3.00	0.017	1.133	3.00	0.021	1.750
4.00	0.018	1.200	6.25	0.028	2.333
5.00	0.022	1.467	7.00	0.030	2.500
7.00	0.028	1.867	8.00	0.033	2.750
8.00	0.030	2.000	9.00	0.035	2.917
9.00	0.034	2.267	10.00	0.039	3.250
10.00	0.036	2.400			
23.75	0.116	7.733			
26.00	0.118	7.867			
27.00	0.127	8.467			
28.00	0.132	8.800			
29.00	0.143	9.533			
31.33	0.161	10.733			
32.33	0.162	10.800			
33.33	0.167	11.133			
33.66	0.168	11.200			
48.00	0.174	11.600			
49.50	0.172	11.467			

TABLA 5.15

CINETICA DEL CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. F.5			Expto. F.6		
So= 0.1 g/L Io= 1955 lux			So= 0.1 g/L Io= 1955 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.018	1.000	0.00	0.016	1.000
1.00	0.017	0.944	13.50	0.061	3.812
2.00	0.018	1.000	14.25	0.064	4.000
3.00	0.019	1.056	15.00	0.069	4.313
4.00	0.021	1.167	16.50	0.079	4.937
5.00	0.025	1.389	17.50	0.089	5.562
7.00	0.029	1.611	20.00	0.096	6.000
8.00	0.032	1.778			
9.00	0.034	1.889			

Expto. F.7			Expto. F.8		
So= 0.1 g/L Io= 1938 lux			So= 0.1 g/L Io= 1938 lux		
t,h	C ,g/L	C /Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.012	1.000
0.66	0.020	1.333	1.00	0.015	1.250
14.33	0.052	3.467	2.00	0.018	1.500
16.66	0.059	3.933	3.00	0.021	1.750
17.66	0.064	4.267	6.25	0.028	2.333
18.66	0.069	4.600	7.00	0.031	2.583
19.66	0.073	4.867	8.00	0.034	2.833
22.00	0.102	6.800	9.00	0.036	3.000
23.00	0.112	7.467	10.00	0.042	3.500
24.00	0.124	8.267	23.25	0.095	7.917
24.33	0.131	8.733	24.25	0.092	7.667
38.66	0.161	10.733	25.00	0.093	7.750
40.16	0.151	10.067	26.50	0.101	8.417
			27.50	0.104	8.667
			30.00	0.118	9.833

TABLA 5.16

CINETICA DEL CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. F.9

So= 0.5 g/L Io= 1955 lux

t,h	C ,g/L	C/Co
0.50	0.014	1.000
2.25	0.018	1.286
5.25	0.026	1.857
7.25	0.031	2.214
9.50	0.042	3.000
22.25	0.261	18.643
24.75	0.259	18.500
27.25	0.261	18.643
29.50	0.283	20.214
31.25	0.305	21.786
33.00	0.306	21.857
46.00	0.294	21.000
49.50	0.276	19.714

Expto. F.10

So= 1g/l Io= 1938 lux

t,h	C ,g/L	C/Co
0.50	0.012	1.000
2.25	0.016	1.333
5.25	0.023	1.917
7.25	0.027	2.250
9.50	0.031	2.583
22.25	0.147	12.250
24.75	0.234	19.500
27.25	0.349	29.083
29.50	0.501	41.750
31.25	0.531	44.250
33.00	0.518	43.167
46.00	0.473	39.417
49.50	0.433	36.083

Expto. F.11

So= 1g/l Io= 1938 lux

t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.009	1.000
3.00	0.020	2.222
5.50	0.028	3.111
19.75	0.101	11.222
21.75	0.125	13.889
24.00	0.160	17.778
27.00	0.254	28.222
29.75	0.354	39.333
43.75	0.557	61.889
45.75	0.580	64.444
48.25	0.570	63.333
50.75	0.603	67.000

TABLA 5.15

CINETICA DEL CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. F.5			Expto. F.6		
So= 0.1 g/L Io= 1955 lux			So= 0.1 g/L Io= 1955 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.018	1.000	0.00	0.016	1.000
1.00	0.017	0.944	13.50	0.061	3.812
2.00	0.018	1.000	14.25	0.064	4.000
3.00	0.019	1.056	15.00	0.069	4.313
4.00	0.021	1.167	16.50	0.079	4.937
5.00	0.025	1.389	17.50	0.089	5.562
7.00	0.029	1.611	20.00	0.096	6.000
8.00	0.032	1.778			
9.00	0.034	1.889			

Expto. F.7			Expto. F.8		
So= 0.1 g/L Io= 1938 lux			So= 0.1 g/L Io= 1938 lux		
t,h	C ,g/L	C /Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.012	1.000
0.66	0.020	1.333	1.00	0.015	1.250
14.33	0.052	3.467	2.00	0.018	1.500
16.66	0.059	3.933	3.00	0.021	1.750
17.66	0.064	4.267	6.25	0.028	2.333
18.66	0.069	4.600	7.00	0.031	2.583
19.66	0.073	4.867	8.00	0.034	2.833
22.00	0.102	6.800	9.00	0.036	3.000
23.00	0.112	7.467	10.00	0.042	3.500
24.00	0.124	8.267	23.25	0.095	7.917
24.33	0.131	8.733	24.25	0.092	7.667
38.66	0.161	10.733	25.00	0.093	7.750
40.16	0.151	10.067	26.50	0.101	8.417
			27.50	0.104	8.667
			30.00	0.118	9.833

TABLA 5.16

CINETICA DEL CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. F.9

So= 0.5 g/L Io= 1955 lux

t,h	C ,g/L	C/Co
0.50	0.014	1.000
2.25	0.018	1.286
5.25	0.026	1.857
7.25	0.031	2.214
9.50	0.042	3.000
22.25	0.261	18.643
24.75	0.259	18.500
27.25	0.261	18.643
29.50	0.283	20.214
31.25	0.305	21.786
33.00	0.306	21.857
46.00	0.294	21.000
49.50	0.276	19.714

Expto. F.10

So= 1g/l Io= 1938 lux

t,h	C ,g/L	C/Co
0.50	0.012	1.000
2.25	0.016	1.333
5.25	0.023	1.917
7.25	0.027	2.250
9.50	0.031	2.583
22.25	0.147	12.250
24.75	0.234	19.500
27.25	0.349	29.083
29.50	0.501	41.750
31.25	0.531	44.250
33.00	0.518	43.167
46.00	0.473	39.417
49.50	0.433	36.083

Expto. F.11

So= 1g/l Io= 1938 lux

t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.009	1.000
3.00	0.020	2.222
5.50	0.028	3.111
19.75	0.101	11.222
21.75	0.125	13.889
24.00	0.160	17.778
27.00	0.254	28.222
29.75	0.354	39.333
43.75	0.557	61.889
45.75	0.580	64.444
48.25	0.570	63.333
50.75	0.603	67.000

TABLA 5.17

CINETICA DEL CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. F.12			Expto. F.13		
So= 0.1 g/L Io= 1461 lux			So= 0.5 g/L Io= 1427 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.012	1.000	0.00	0.015	1.000
0.92	0.016	1.333	0.92	0.020	1.333
1.83	0.018	1.500	1.83	0.022	1.467
4.75	0.027	2.250	4.75	0.032	2.133
5.75	0.031	2.583	5.75	0.035	2.333
6.75	0.034	2.833	6.75	0.042	2.800
7.75	0.041	3.417	7.75	0.048	3.200
21.75	0.077	6.417	21.75	0.194	12.933
22.75	0.076	6.333	22.75	0.197	13.133
23.75	0.072	6.000	23.75	0.187	12.467
24.75	0.075	6.250	24.75	0.185	12.333
25.75	0.078	6.500	25.75	0.191	12.733
29.25	0.088	7.333	29.25	0.213	14.200

Expto. F.14

So= 1 g/L		Io= 1351 lux
t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000
0.92	0.016	1.067
1.83	0.019	1.267
4.75	0.028	1.867
5.75	0.034	2.267
6.75	0.036	2.400
7.75	0.041	2.733
21.75	0.378	25.200
22.75	0.358	23.867
23.75	0.363	24.200
24.75	0.354	23.600
25.75	0.364	24.267
29.25	0.359	23.933

TABLA 5.18

CINETICA DEL CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. F.15 So= 0.1 g/L Io= 429 lux			Expto. F.16 So= 0.1 g/L Io= 429 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.016	1.000	0.00	0.011	1.000
2.25	0.022	1.375	14.00	0.035	3.182
5.00	0.028	1.750	16.00	0.044	4.000
8.25	0.030	1.875	18.00	0.044	4.000
21.75	0.069	4.313	21.00	0.054	4.909
25.00	0.068	4.250	23.50	0.066	6.000
26.75	0.067	4.187	37.75	0.097	8.818
29.25	0.066	4.125	40.00	0.100	9.091
32.00	0.069	4.313	45.00	0.105	9.545
46.75	0.101	6.313			

Expto. F.17 So= 0.1 g/L Io= 429 lux			Expto. F.18 So= 0.1 g/L Io= 436 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.012	1.000	0.00	0.012	1.000
1.00	0.016	1.333	1.00	0.019	1.583
2.00	0.017	1.417	2.00	0.020	1.667
2.50	0.020	1.667	2.50	0.023	1.917
3.00	0.020	1.667	3.00	0.023	1.917
5.50	0.027	2.250	5.50	0.031	2.583
6.50	0.030	2.500	6.50	0.031	2.583
7.00	0.034	2.833	7.00	0.036	3.000
8.00	0.037	3.083			
22.50	0.054	4.500			
23.50	0.053	4.417			
24.50	0.052	4.333			
25.50	0.052	4.333			

Expto. F.19 So= 0.1 g/L Io= 429 lux			Expto. F.20 So= 0.1 g/L Io= 400 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.015	1.000
1.00	0.015	1.000	1.00	0.015	1.000
2.00	0.019	1.267	2.00	0.019	1.267
3.00	0.022	1.467	3.00	0.022	1.467
4.00	0.023	1.533	4.00	0.024	1.600
5.00	0.026	1.733	5.00	0.026	1.733
6.00	0.028	1.867	6.00	0.029	1.933
8.00	0.037	2.467	8.00	0.039	2.600
9.00	0.040	2.667	9.00	0.040	2.667
10.00	0.043	2.867	10.00	0.044	2.933
11.00	0.046	3.067	11.00	0.044	2.933
12.00	0.048	3.200			
12.50	0.050	3.333			

TABLA 5.19

CINETICA DEL CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Expto. F.21			Expto. F.22		
So= 0.5 g/L Io= 436 lux			So= 1 g/L Io= 400 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.017	1.000	0.00	0.013	1.000
2.25	0.023	1.353	2.25	0.018	1.385
5.00	0.027	1.588	5.00	0.026	2.000
8.25	0.032	1.882	8.25	0.029	2.231
21.75	0.200	11.765	21.75	0.346	26.615
25.00	0.190	11.176	25.00	0.352	27.077
26.75	0.189	11.118	26.75	0.341	26.231
29.25	0.183	10.765	29.25	0.327	25.154
32.00	0.180	10.588	32.00	0.321	24.692
46.75	0.192	11.294	46.75	0.330	25.385

Expto. F.23			Expto. F.24		
So= 1 g/L Io= 400 lux			So = 1 g/L Io = 436 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.011	1.000	0.00	0.012	1.000
14.00	0.036	3.273	14.00	0.035	2.917
16.00	0.046	4.182	16.00	0.043	3.583
18.00	0.050	4.545	18.00	0.051	4.250
21.00	0.063	5.727	21.00	0.064	5.333
23.50	0.075	6.818	23.50	0.077	6.417
37.75	0.481	43.727	37.75	0.486	40.500
40.00	0.468	42.545	40.00	0.454	37.833
45.00	0.488	44.364	45.00	0.460	38.333



## CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Intensidades medias de iluminación, lux

EXPTO.		I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>0</sub>
F.1,F.2,F.3,F.4		1983	1947	1902	1891	2084	1963
F.5,F.6,F.9,PHF.4		1963	1936	1902	1901	2090	1955
F.7,F.8,F.10,F.11		1953	1930	1881	1856	2068	1938
F.12		1444	1428	1425	1437	1632	1461
F.13		1427	1425	1425	1431	1425	1427
F.14		1226	1328	1320	1323	1501	1351
F.15,F.16,F.17,F.19	429	427	421	419	451	429	
F.18,F.21,F.24		433	430	430	430	465	436
F.22,F.23,F.20		399	395	391	389	437	400

En la Figura 5.5 se ha representado en coordenadas semilogarítmicas la totalidad de los datos cinéticos experimentales concentración adimensional de biomasa-tiempo para el nivel superior de intensidad de iluminación y las tres concentraciones de glucosa ensayadas, sin hacer distinción entre experimentos individuales. El mismo tipo de representación, Figuras 5.6 y 5.7, se ha realizado para los niveles de 1400 y 400 lux.

En las citadas gráficas se distingue una zona exponencial de crecimiento fotoheterotrófico y una zona estacionaria que se produce al agotarse el sustrato orgánico. Las zonas exponenciales son todas de aproximadamente igual pendiente y las zonas estacionarias se producen a concentraciones de biomasa distintas, función de la cantidad inicial de sustrato orgánico aportado al medio de cultivo, en cada caso.

FOTOHETEROTROFICO  $I_0 = 2000 \text{ lux}$

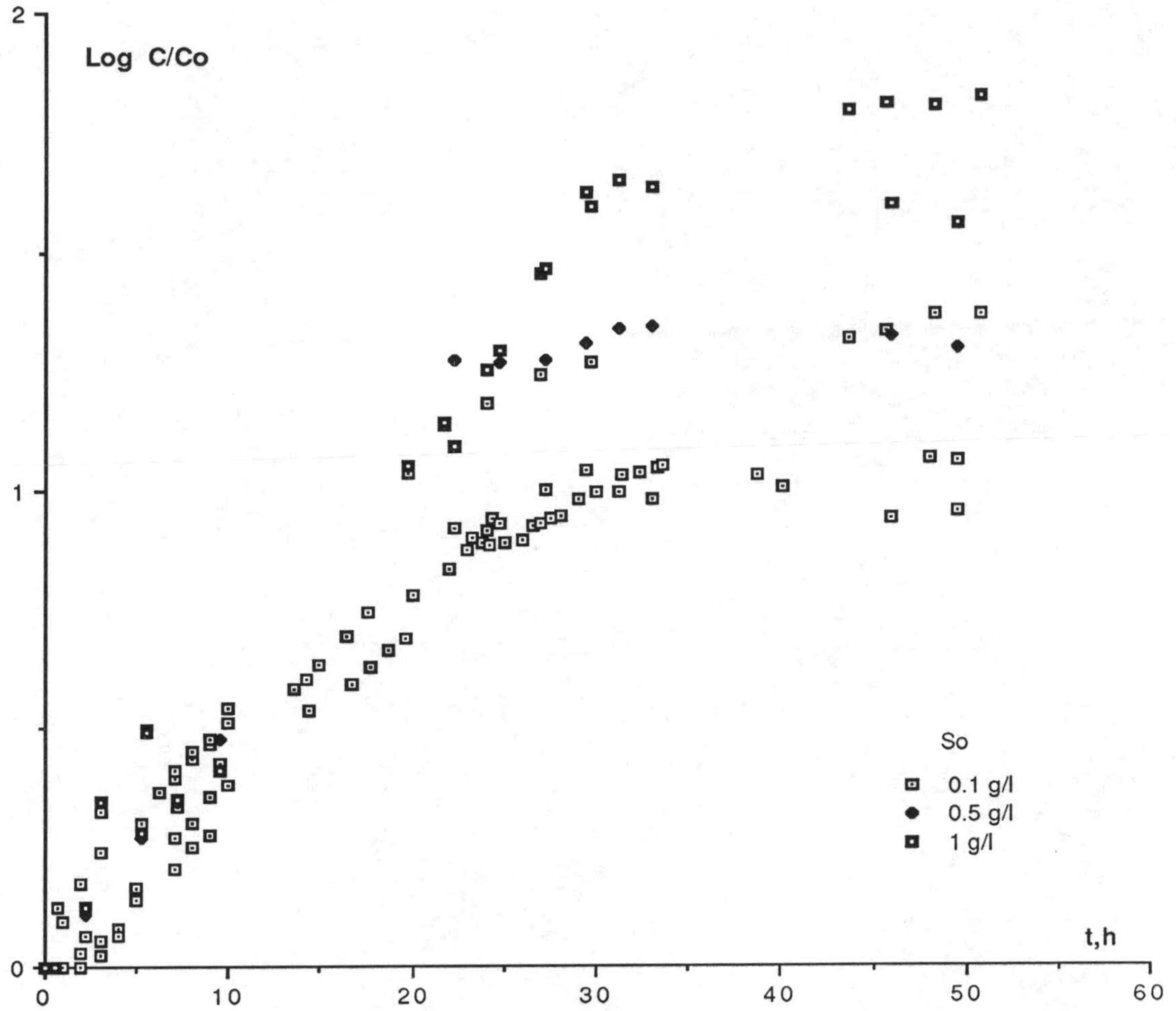


Fig 5.5

FOTOHETEROTROFICO  $I_0 = 1400 \text{ lux}$

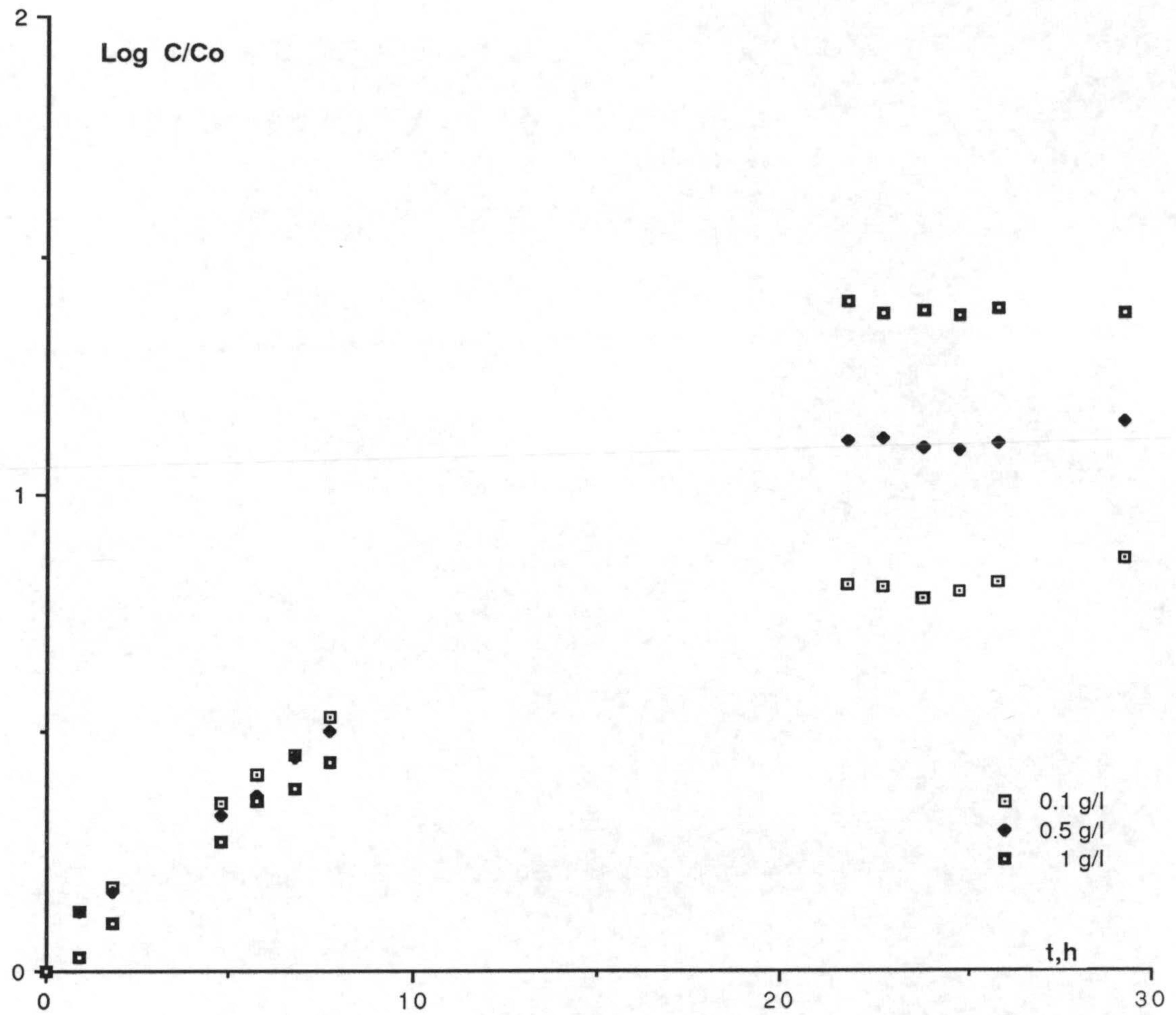


Fig 5.6

FOTOHETEROTROFICO  $I_0 = 400 \text{ lux}$

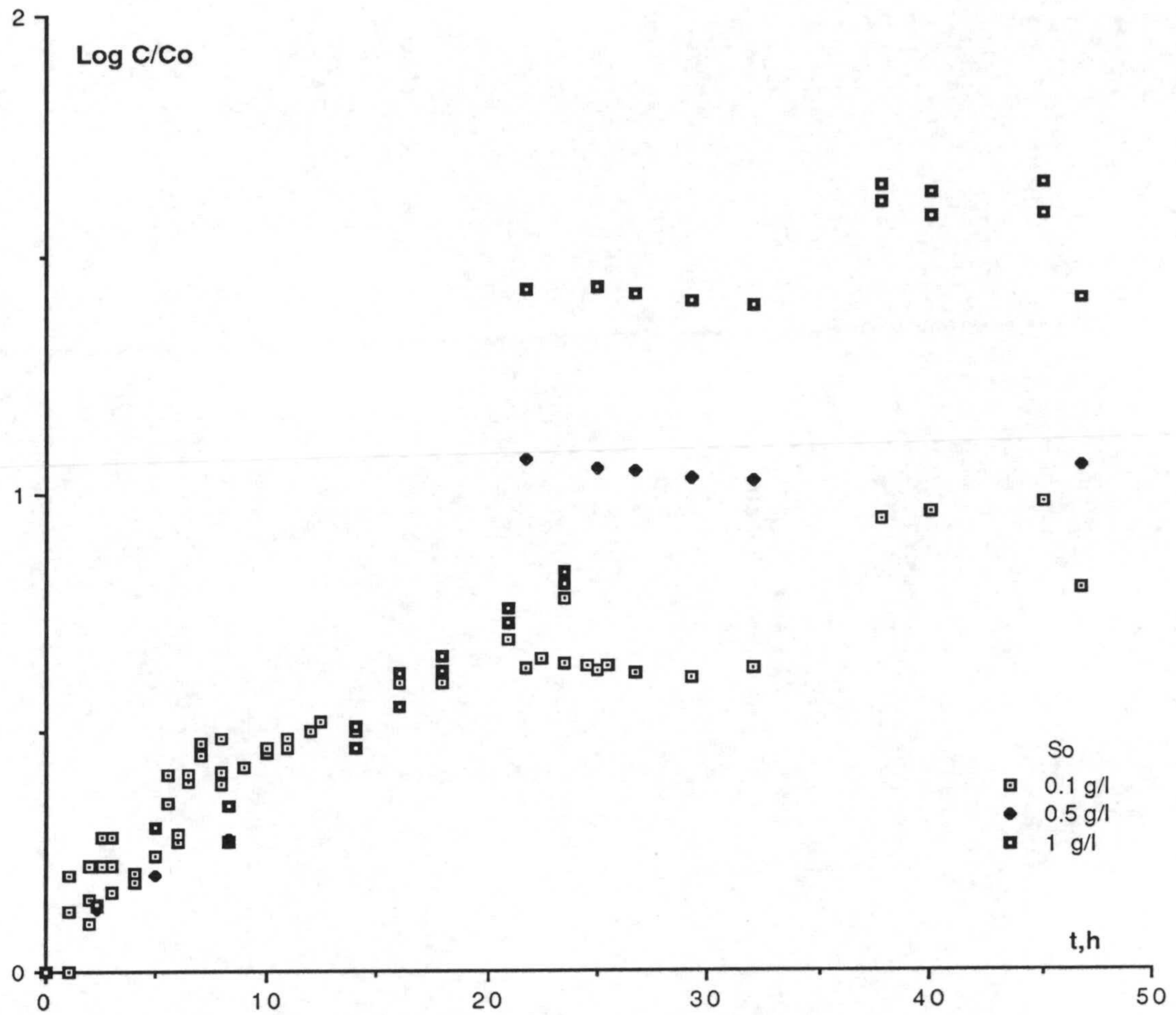


Fig. 5.7

### 5.3 CRECIMIENTO ANAEROBIO

Estos experimentos se realizaron en un rango de concentraciones de sustrato orgánico, glucosa, comprendido entre 0.1 y 10 g/L y una única intensidad de iluminación inicial.

La intensidad de iluminación seleccionada fue la correspondiente al nivel superior de 2000 lux. La realización de unos experimentos previos a intensidades de iluminación menores reveló, dadas las condiciones tan desfavorables para el crecimiento del alga, la existencia de una gran contaminación de bacterias anaerobias que predominaban sobre la población de algas, enmascarando los datos cinéticos de la concentración de biomasa.

En estos experimentos se amplió el margen de concentración de sustrato orgánico hasta 10 g/L, tratando de investigar una posible inhibición por sustrato que se detectaría con mayor facilidad en este tipo de crecimiento.

Se llevaron a cabo pues, 6 ensayos a concentraciones de glucosa de 0.1, 0.5, 1, 4, 6 y 10 g/L respectivamente a la intensidad de iluminación inicial de 2000 lux aproximadamente. Los datos cinéticos de estos experimentos están recogidos en las tablas 5.20 y 5.21. Identificando la letra A este tipo crecimiento.

La intensidad de iluminación inicial por secciones y la inicial global se indican seguidamente:

#### CRECIMIENTO ANAEROBIO

Intensidades medias de iluminación, lux

EXPTO.	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>
A.1	2130	2109	2049	2045	2192	2108
A.2	2157	2150	2085	2026	2215	2131
A.3	1959	1919	1872	1852	2045	1933
A.4	2098	2026	1928	1898	2083	2027
A.5	1993	1913	1930	2011	2133	1991
A.6	1914	1910	1846	1849	2087	1914

TABLA 5.20

CINETICA DEL CRECIMIENTO ANAEROBIO

Expto. A. 1			Expto. A. 2		
So= 0.1 g/L Io= 2108 lux			So= 0.5 g/L Io= 2131 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.015	1.000
1.00	0.015	1.000	1.00	0.017	1.133
2.00	0.015	1.000	2.00	0.018	1.200
3.00	0.018	1.200	3.00	0.020	1.333
4.00	0.023	1.533	4.00	0.023	1.533
5.00	0.024	1.600	5.00	0.026	1.733
7.00	0.031	2.067	7.00	0.034	2.267
8.00	0.034	2.267	8.00	0.035	2.333
9.00	0.042	2.800	9.00	0.042	2.800
10.00	0.049	3.267	10.00	0.050	3.333
24.00	0.088	5.867	24.00	0.243	16.200
25.00	0.089	5.933	25.00	0.266	17.733
26.00	0.090	6.000	26.00	0.266	17.733
27.00	0.085	5.667	27.00	0.263	17.533
28.00	0.088	5.867	28.00	0.264	17.600
28.75	0.089	5.933	28.75	0.265	17.667
32.50	0.091	6.067	32.50	0.263	17.533

Expto. A.3			Expto. A.4		
So= 1 g/L Io= 1933 lux			So= 4 g/L Io= 2027 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C,g/L	C/Co
0.00	0.013	1.000	0.00	0.013	1.000
1.00	0.014	1.077	5.50	0.028	2.154
2.00	0.016	1.231	7.75	0.036	2.769
3.00	0.017	1.308	8.50	0.039	3.000
4.00	0.020	1.538	9.25	0.043	3.308
5.00	0.023	1.769	12.00	0.064	4.923
7.00	0.031	2.385	24.00	0.259	19.923
8.00	0.033	2.538	25.00	0.291	22.385
9.00	0.042	3.231	26.00	0.317	24.385
10.00	0.050	3.846	27.00	0.346	26.615
24.00	0.248	19.077	28.00	0.383	29.462
25.00	0.271	20.846	29.00	0.419	32.231
26.00	0.282	21.692	31.50	0.598	46.000
27.00	0.304	23.385	32.50	0.691	53.154
28.00	0.322	24.769	33.50	0.782	60.154
28.75	0.328	25. 231	34.25	0.834	64.154
32.50	0.403	31. 000	50.50	1.459	112.231
			51.50	1.532	117.846
			52.50	1.535	118.077
			71.50	1.842	141.692

TABLA 5.21

CINETICA DEL CRECIMIENTO ANAEROBIO

Expto. A.5			Expto. A.6		
So= 6 g/L Io= 1991 lux			So= 10 g/L Io= 1914 lux		
t,h	C ,g/L	C/Co	t,h	C ,g/L	C/Co
0.00	0.017	1.000	0.00	0.012	1.000
5.50	0.039	2.294	5.50	0.028	2.333
7.75	0.053	3.118	7.75	0.037	3.083
8.50	0.057	3.353	8.50	0.041	3.417
9.25	0.063	3.706	9.25	0.044	3.667
12.00	0.091	5.353	12.00	0.066	5.500
24.00	0.356	20.941	24.00	0.281	23.417
25.00	0.394	23.176	25.00	0.317	26.417
26.00	0.438	25.765	26.00	0.350	29.167
27.00	0.492	28.941	27.00	0.383	31.917
28.00	0.547	32.176	28.00	0.416	34.667
29.00	0.605	35.588	29.00	0.477	39.750
31.50	0.869	51.118	31.50	0.747	62.250
32.50	0.902	53.059	32.50	0.802	66.833
33.50	0.934	54.941	33.50	0.837	69.750
34.25	0.966	56.824	34.25	0.875	72.917
50.50	1.258	74.000	50.50	1.240	103.333
51.50	1.276	75.059	51.50	1.225	102.083
52.50	1.280	75.294	52.50	1.295	107.917
71.50	1.422	83.647	71.50	1.510	125.833

Los datos cinéticos experimentales se han representado en la Figura 5.8.  
Las pendientes de la zona de crecimiento exponencial son:

<u>Expto.</u>	<u>Io,lux</u>	<u>So, g/L</u>	<u>Pendiente</u>
A.1	2108	0.1	0.0501
A.2	2131	0.5	0.0494
A.3	1933	1	0.0540
A.4	2027	4	0.0512
A.5	1991	6	0.0506
A.6	1914	10	0.0532

prácticamente coincidentes.

Se aprecia en la Figura 5.8, que a concentraciones bajas de glucosa se alcanza una zona estacionaria, debida al consumo total de sustrato orgánico y a concentraciones altas aparece una zona de crecimiento lineal, debida a la limitación por la luz existente a las altas concentraciones de biomasa alcanzadas en el cultivo.



ANAEROBIO  $I_0 = 2000 \text{ lux}$

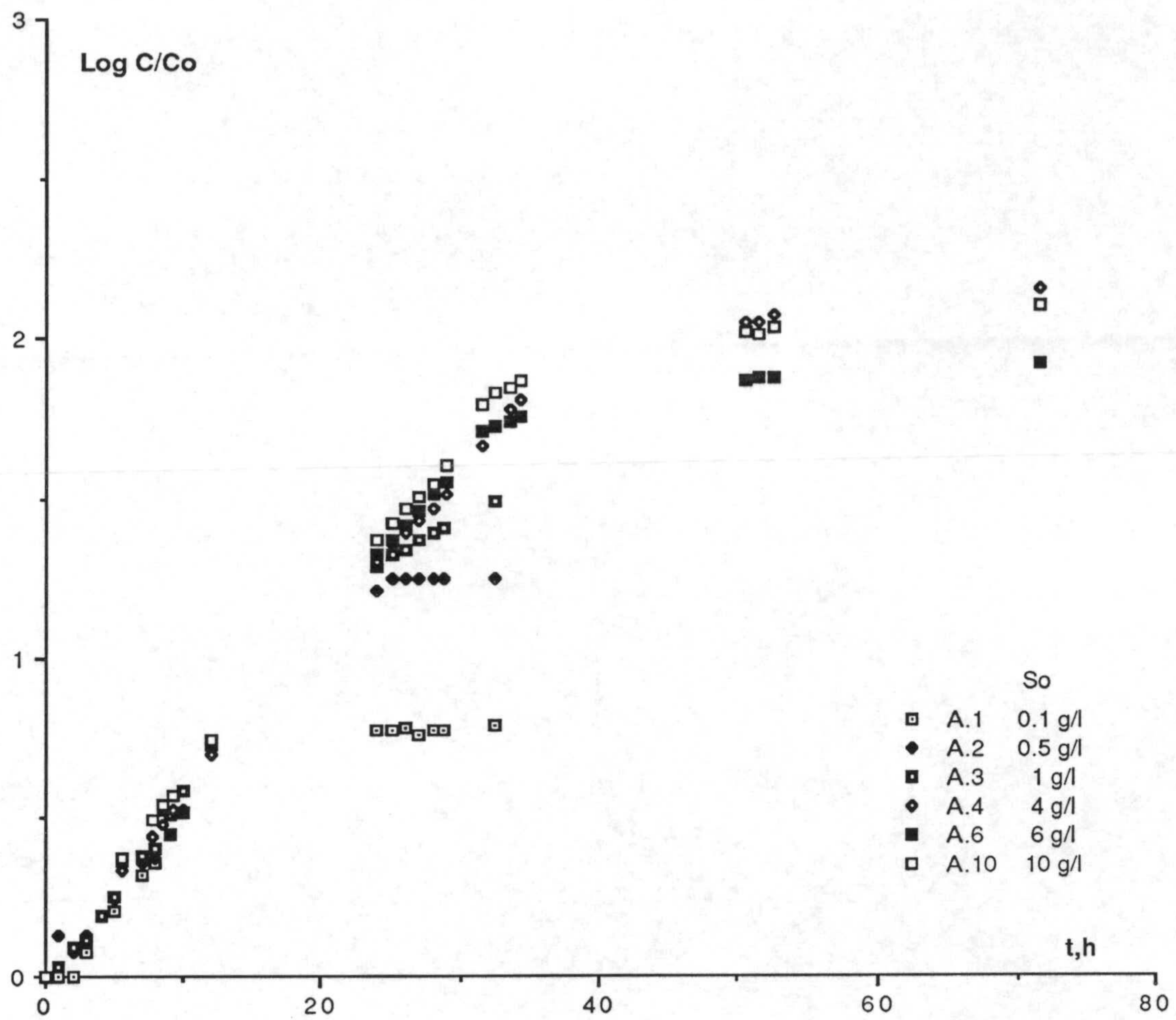


Fig 5.8

#### 5.4 INFLUENCIA DE LA ADICION DE DCMU

A fin de profundizar en la interpretación de los diversos tipos de crecimiento, se ha procedido a la adición de D.C.M.U, sustancia inhibidora de la fotosíntesis, que como se ha visto en el apartado 2.3.1.4 de esta Memoria bloquea la fotosíntesis, al impedir el mecanismo de transferencia de electrones desde el aceptor primario al secundario del fotosistema II.

Se han realizado experimentos de crecimiento mixotrófico y anaerobio a  $T= 30^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH} = 6.5$  . La intensidad de iluminación ha sido la del nivel máximo, aproximadamente 2000 lux, y como sustrato orgánico se utilizó glucosa a tres concentraciones distintas, 0.1,0.5 y 1 g/L . La concentración utilizada de DCMU para todos los experimentos ha sido de  $10^{-6}$  M.

En las Tablas 5.22 y 5.23 se recogen los datos experimentales .La primera letra, I, indica el inhibidor y la segunda el tipo de crecimiento, M, para mixotrófico y A, para anaerobio, el número indica el orden dentro de la serie.

En las Figuras 5.9 y 5.10 se ha representado gráficamente el crecimiento en el tiempo, la ordenada representa  $\text{Log } C/\text{Co}$  y la abcisa el tiempo en horas, para cada tipo de crecimiento.

TABLA 5.22

CINETICA DEL CRECIMIENTO CON EL INHIBIDOR DCMU

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

Expto. IM.1			Expto. IM.2		
So= 0.1 g/L			So = 0.5 g/L		
t,h	C, g/L	C/Co	t,h	C, g/L	C/Co
0.00	0.014	1.000	0.00	0.020	1.000
0.50	0.015	1.071	0.50	0.021	1.050
1.25	0.017	1.214	1.25	0.023	1.150
2.25	0.019	1.357	2.25	0.026	1.300
12.25	0.031	2.214	12.25	0.038	1.900
15.25	0.037	2.643	15.25	0.047	2.350
21.25	0.055	3.929	21.25	0.082	4.100
21.75	0.055	3.929	21.75	0.090	4.500
22.75	0.055	3.929	22.75	0.105	5.250
23.50	0.055	3.929	23.50	0.121	6.050
26.25	0.052	3.714	26.25	0.204	10.200
36.50	0.049	3.500	36.50	0.158	7.900
39.75	0.048	3.429	39.75	0.141	7.050
45.50	0.046	3.286	45.50	0.124	6.200

Expto. IM.3		
So= 1 g/L		
t,h	C, g/L	C/Co
0.00	0.018	1.000
0.50	0.020	1.111
1.25	0.020	1.111
2.25	0.022	1.222
12.25	0.039	2.167
15.25	0.049	2.722
21.25	0.093	5.167
21.75	0.100	5.556
22.75	0.117	6.500
23.50	0.133	7.389
26.25	0.215	11.944
36.50	0.320	17.778
39.75	0.295	16.389
45.50	0.268	14.889

TABLA 5.23

CINETICA DEL CRECIMIENTO CON EL INHIBIDOR DCMU

CRECIMIENTO ANAEROBIO

Expto. IA.4			Expto. IA.5		
So= 0.1 g/L			So = 0.5 g/L		
t,h	C, g/L	C/Co	t,h	C, g/L	C/Co
0.00	0.013	1.000	0.00	0.016	1.000
0.50	0.015	1.154	0.50	0.018	1.125
1.25	0.015	1.154	1.25	0.019	1.187
1.75	0.016	1.231	1.75	0.020	1.250
2.50	0.017	1.308	2.50	0.022	1.375
3.50	0.019	1.462	3.50	0.023	1.437
15.00	0.038	2.923	15.00	0.056	3.500
18.50	0.054	4.154	18.50	0.079	4.937
23.75	0.056	4.308	23.75	0.182	11.375
26.00	0.055	4.231	26.00	0.212	13.250
27.00	0.052	4.000	27.00	0.202	12.625
28.00	0.050	3.846	28.00	0.195	12.188

Expto. IA.6		
So= 1 g/L		
t,h	C, g/L	C/Co
0.00	0.016	1.000
0.50	0.016	1.000
1.25	0.018	1.125
1.75	0.018	1.125
2.50	0.019	1.187
3.50	0.020	1.250
15.00	0.084	5.250
18.50	0.129	8.063
23.75	0.372	23.250
26.00	0.376	23.500
27.00	0.365	22.813
28.00	0.353	22.063

CRECIMIENTO MIXOTROFICO. DCMU

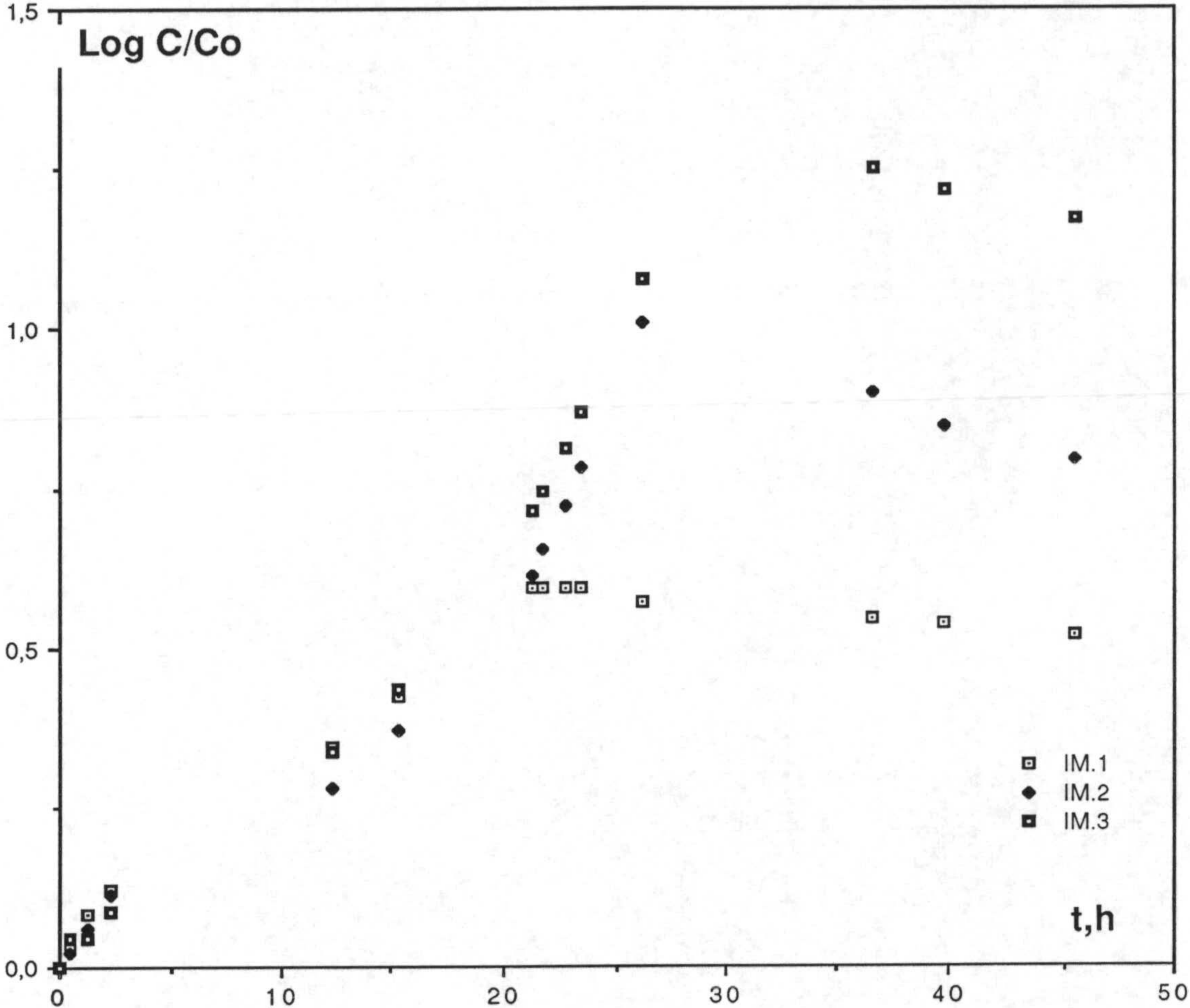


FIG 5.9

# CRECIMIENTO ANAEROBIO. DCMU

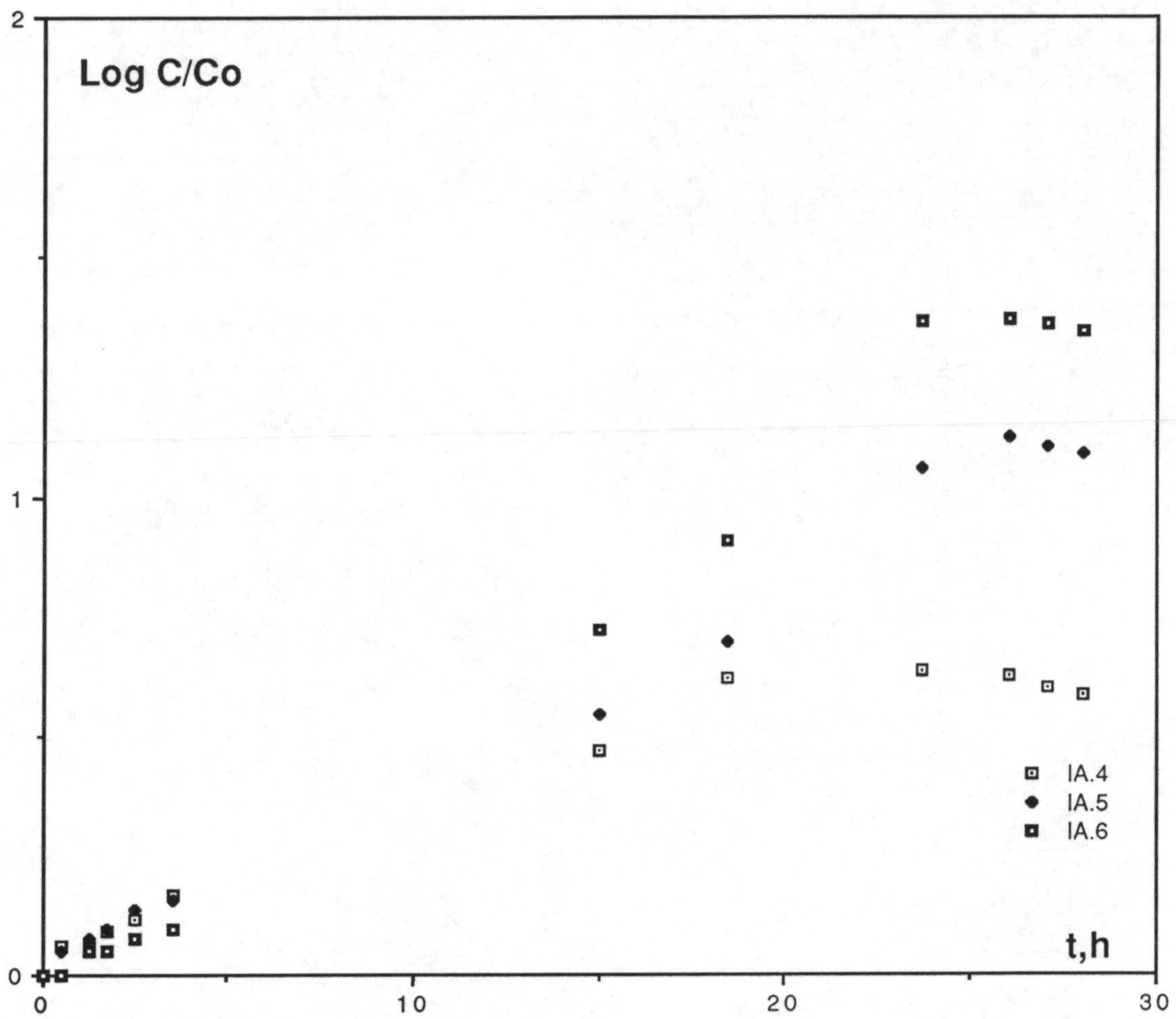


FIG. 5.10

En las curvas de crecimiento se observa claramente que despues de una zona de crecimiento exponencial se produce un descenso de la concentración de células. Lo que indica que una vez terminada la glucosa hay una clara insuficiencia en las algas debido a la falta de fuente de carbono, de fuente de energía o de ambas a la vez.

## 5.5 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL SUSTRATO

Para el estudio experimental de la influencia de la naturaleza del sustrato orgánico, se han realizado experimentos usando acetato y etanol en vez de glucosa, y para los crecimientos mixotrófico, fotoheterotrófico y anaerobio.

Los experimentos citados se realizaron a los valores de pH = 6.5 y temperatura de 30 °C, la intensidad de iluminación fué de 2000 lux.

En la Tablas 5.24, 5.25 y 5.26 se recogen estos resultados. Para estos experimentos las dos primeras letras identifican el sustrato usado AC acetato y ET etanol. La tercera letra identifica el tipo de crecimiento M mixotrófico, F fotoheterotrófico y A anaerobio. El número indica el orden de realización dentro de su serie.

Estos experimentos se han representado gráficamente en las Figuras 5.11 y 5.12 una para cada tipo de sustrato utilizado.

Al igual que en glucosa puede observarse en estas curvas de crecimiento una primera zona de crecimiento exponencial y una zona estacionaria. En los crecimientos mixotróficos apenas si se presenta la zona estacionaria, pero se observa perfectamente una tercera zona de crecimiento exponencial autotrófica.

Asimismo se ha intentado utilizar otro tipo de sustrato orgánico, el acetaldehído. Para este sustrato no se ha podido obtener crecimiento alguno de la microalga bajo ninguna de las condiciones experimentales ensayadas en esta investigación.



TABLA 5.24

INFLUENCIA DEL SUSTRATO

Expto. ACM.1			Expto. ACF.1		
MIXOTROFICO			FOTOHETEROTROFICO		
ACETATO So= 1mM			ACETATO So = 1mM		
t,h	C, g/L	C/Co	t,h	C, g/L	C/Co
0.00	0.013	1.000	0.00	0.014	1.000
1.00	0.013	1.000	0.50	0.016	1.143
2.00	0.015	1.154	1.50	0.018	1.286
3.00	0.017	1.308	2.50	0.020	1.429
4.00	0.019	1.462	3.50	0.025	1.786
5.00	0.022	1.692	4.50	0.029	2.071
6.50	0.026	2.000	5.50	0.036	2.571
7.50	0.028	2.154	6.50	0.042	3.000
8.50	0.033	2.538	7.50	0.050	3.571
9.50	0.036	2.769	8.75	0.061	4.357
10.50	0.039	3.000	9.75	0.064	4.571
23.25	0.084	6.462	11.50	0.069	4.929
24.00	0.088	6.769	23.50	0.084	6.000
24.75	0.094	7.231	25.75	0.086	6.143
25.25	0.097	7.462	26.75	0.092	6.571
25.75	0.100	7.692			
26.25	0.103	7.923			

TABLA 5.25

INFLUENCIA DEL SUSTRATO

Expto. ACA.1			Expto. ETM.1		
ANAEROBIO			MIXOTROFICO		
ACETATO So= 1mM			ETANOL So = 1mM		
t,h	C, g/L	C/Co	t,h	C, g/L	C/Co
0.00	0.020	1.000	0.00	0.011	1.000
2.17	0.020	1.000	1.00	0.012	1.091
3.25	0.023	1.150	2.00	0.012	1.091
3.50	0.023	1.150	3.00	0.014	1.273
4.17	0.026	1.300	4.00	0.016	1.455
4.25	0.024	1.200	5.00	0.018	1.636
5.17	0.025	1.250	6.50	0.022	2.000
5.33	0.026	1.300	7.50	0.025	2.273
8.00	0.032	1.600	8.50	0.029	2.636
8.75	0.034	1.700	9.50	0.031	2.818
10.25	0.039	1.950	10.50	0.034	3.091
26.50	0.071	3.550	23.25	0.068	6.182
27.25	0.073	3.650	24.00	0.071	6.455
28.00	0.074	3.700	25.25	0.078	7.091
			25.75	0.079	7.182
			26.25	0.081	7.364

TABLA 5.26

INFLUENCIA DEL SUSTRATO

Expto. ETA.1			Expto. ETF.1		
ANAEROBIO			FOTOHETEROTROFICO		
ETANOL So= 1mM			ETANOL So = 1mM		
t,h	C, g/L	C/Co	t,h	C, g/L	C/Co
0.00	0.015	1.000	0.00	0.015	1.000
2.17	0.018	1.200	0.50	0.016	1.067
3.25	0.020	1.333	1.50	0.019	1.267
3.50	0.020	1.333	2.50	0.018	1.200
4.17	0.023	1.533	3.50	0.021	1.400
4.25	0.023	1.533	4.50	0.024	1.600
5.17	0.024	1.600	5.50	0.027	1.800
5.33	0.025	1.667	6.50	0.031	2.067
6.25	0.028	1.867	7.50	0.037	2.467
6.33	0.029	1.933	8.75	0.042	2.800
7.00	0.031	2.067	9.75	0.050	3.333
8.00	0.036	2.400	11.50	0.066	4.400
8.75	0.044	2.933	23.50	0.101	6.733
10.25	0.061	4.067	25.75	0.099	6.600
26.50	0.219	14.600	26.75	0.101	6.733
27.25	0.220	14.667			
28.00	0.215	14.333			

# INFLUENCIA DEL SUSTRATO

Acetato 1mM

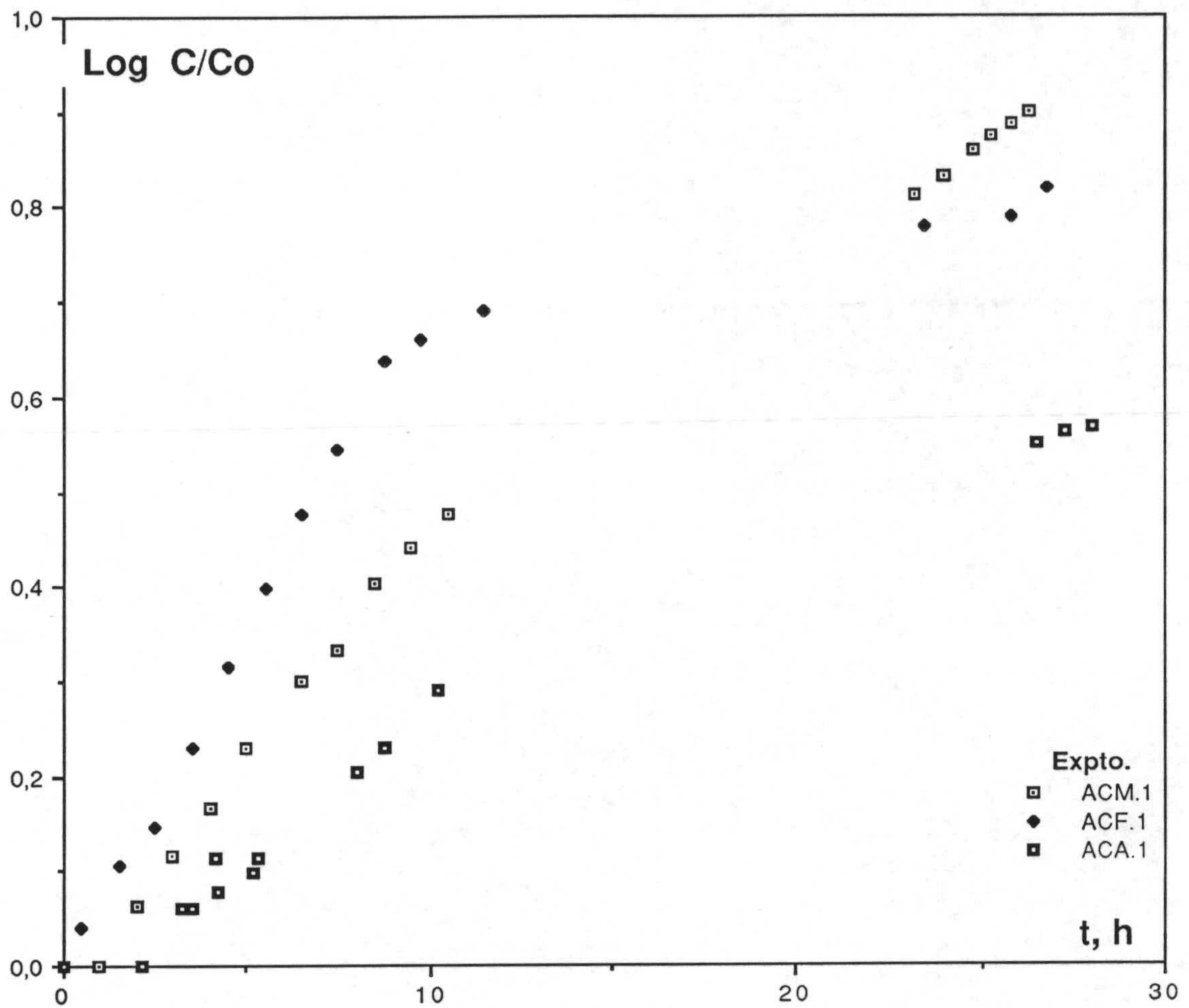


FIG 5.11

# INFLUENCIA DEL SUSTRATO

Etanol 1mM

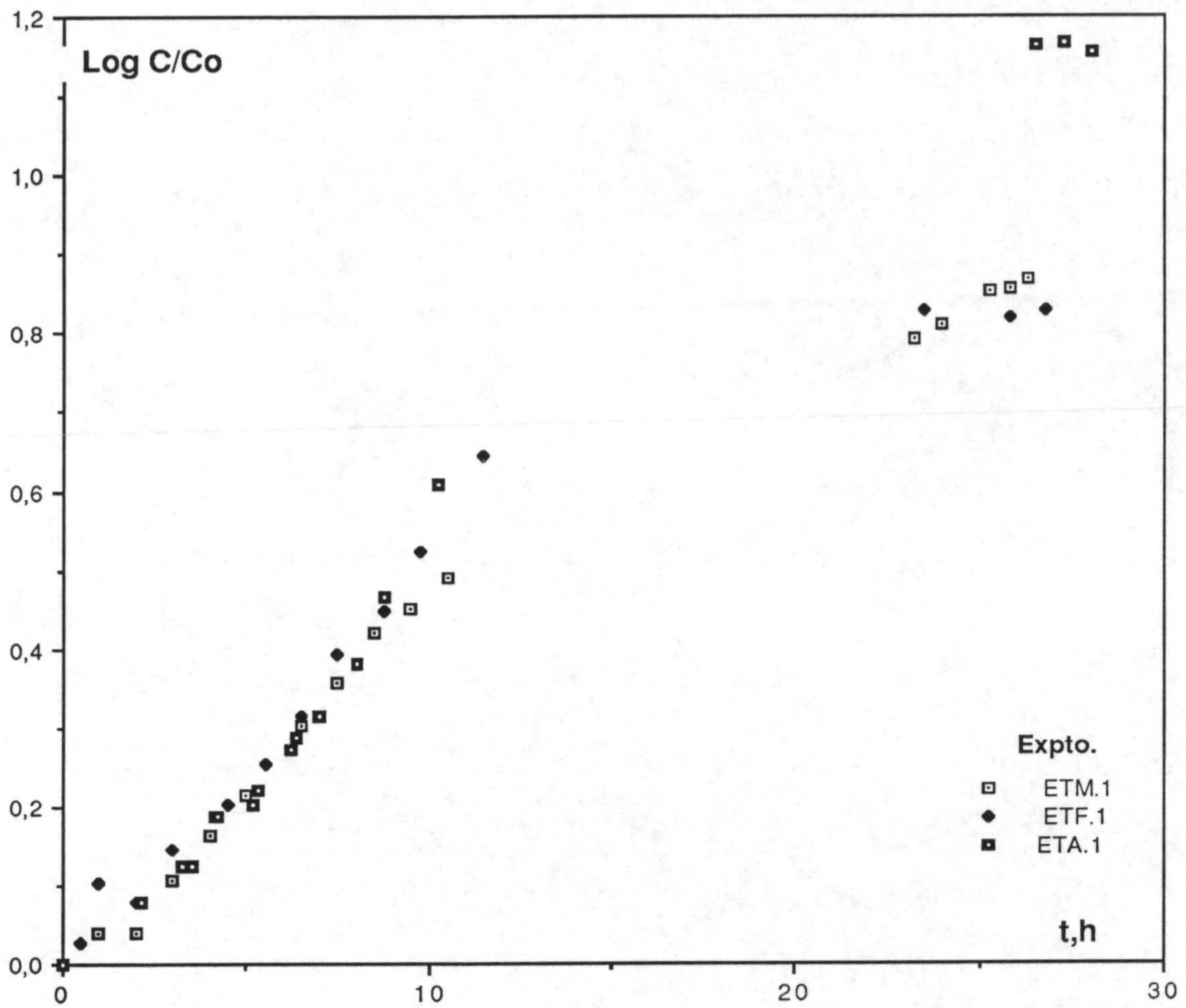


Fig. 5.12

## **6 DISCUSION DE RESULTADOS**

6.1

## 6.1 CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO

Condiciones mixotróficas de crecimiento son aquéllas en que el alga puede disponer de la luz y de un sustrato orgánico como fuentes de energía y del dióxido de carbono y el mismo sustrato orgánico como fuentes de carbono celular.

Para cuantificar este crecimiento se han determinado los siguientes parámetros cinéticos y estequiométricos:

- Velocidad específica de crecimiento.
- Contenido en clorofila..
- Consumo metabólico del sustrato orgánico.
- Rendimiento en biomasa.

### 6.1.1 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

Para analizar la zona de crecimiento exponencial se ha utilizado el parámetro de velocidad específica, determinada en las primeras horas de cada zona y calculada para cada una de las concentraciones iniciales de sustrato orgánico e intensidades iniciales de iluminación empleadas.

En la zona exponencial, la concentración de biomasa, C, varía de acuerdo con la ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = \mu C \quad \mu = \text{cte} \quad [6.1]$$

en la que separando variables

$$\frac{dC}{C} = \mu dt \quad [6.2]$$

e integrando, con la condición inicial  $t=0$   $C=C_0$ , ya que en ninguno de los experimentos considerados se ha observado una fase lag apreciable conduce a:

$$\ln \frac{C}{C_0} = \mu t \quad [6.3]$$

De esta forma si se representa el cociente adimensional  $C/C_0$ , frente al tiempo en h, en coordenadas semilogarítmicas, de la pendiente de la recta que corresponde a la zona exponencial de crecimiento y mediante un ajuste por regresión lineal de los datos experimentales, se obtiene el valor de la velocidad específica en  $h^{-1}$ .

En los apartados siguientes, analizaremos este parámetro para las dos zonas exponenciales de crecimiento que aparecen en estos experimentos:

- Una primera zona de crecimiento mixotrófico propiamente dicho.
- Una zona de crecimiento autotrófico que tiene lugar al consumirse el sustrato orgánico.

#### 6.1.1.1 Zona exponencial de crecimiento mixotrófico

Las velocidades específicas de crecimiento correspondientes a los experimentos M.1 a M.29 y TM.5 realizados a las concentraciones iniciales de glucosa de 0.1;0.5 y 1 g/L ,a la temperatura de 30 °C y a los cuatro niveles de intensidad inicial de 2000; 1400; 800 y 400 lux se indican en las Tablas 6.1, 6.2, 6.3 y 6.4. En cada una de estas tablas correspondientes a una intensidad inicial de iluminación ,  $I_0$ , distinta, los valores de ,  $\mu$ , van agrupados según la concentración inicial de glucosa,  $S_0$ , y se han incluido los valores del coeficiente de regresión lineal obtenidos en el cálculo de  $\mu$  mediante la ecuación [6.3].



TABLA 6.1

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

EXPTO	$I_0, \text{lux}$	$S_0, \text{g/L}$	$\mu, \text{h}^{-1}$	$r^2$
M.1	2027	0.1	0.1286	0.999
M.2	2020	0.1	0.1104	0.999
M.3	2020	0.1	0.1035	0.992
M.4	2020	0.1	0.1003	0.990
M.5	1991	0.5	0.1275	0.989
TM.5	1981	0.5	0.1065	0.999
M.6	1981	0.5	0.1049	0.996
M.7	1981	0.5	0.0890	0.997
M.8	1914	1	0.1223	0.994
M.9	1904	1	0.1056	0.999
M.10	1903	1	0.1004	0.998

TABLA 6.2

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

EXPTO	$I_0, \text{lux}$	$S_0, \text{g/L}$	$\mu, \text{h}^{-1}$	$r^2$
M.12	1386	0.1	0.0792	0.982
M.13	1386	0.1	0.1071	0.999
M.14	1370	0.5	0.0799	0.999
M.15	1370	0.5	0.1139	0.997
M.16	1255	1	0.0806	0.974
M.17	1255	1	0.1194	0.997

TABLA 6.3

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

EXPTO	$I_0, \text{lux}$	$S_0, \text{g/L}$	$\mu, \text{h}^{-1}$	$r^2$
M.18	814	0.1	0.1051	0.960
M.19	814	0.1	0.0707	0.986
M.20	809	0.5	0.1056	0.991
M.21	809	0.5	0.0691	0.998
M.22	802	1	0.1262	0.980
M.23	802	1	0.0792	0.990

TABLA 6.4

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

EXPTO	$I_0, \text{lux}$	$S_0, \text{g/L}$	$\mu, \text{h}^{-1}$	$r^2$
M.24	373	0.1	0.1096	0.962
M.25	370	0.1	0.0997	0.979
M.26	389	0.5	0.1104	0.989
M.27	400	0.5	0.1011	0.990
M.28	367	1	0.1258	0.991
M.29	370	1	0.1132	0.988

#### 6.1.1.1.1 Influencia de la concentración de glucosa

El modelo cinético más utilizado para describir la dependencia de la velocidad específica de crecimiento con la concentración de nutriente limitante es el modelo de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S} \quad [2.16]$$

desarrollado en la Introducción de esta Memoria y que formula que la dependencia del crecimiento con la concentración de un nutriente limitante puede describirse por dos constantes: la velocidad específica máxima  $\mu_m$  y la constante de saturación  $K_S$ .

En la Figura. 6.1 se han representado en coordenadas lineales los valores de la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  frente a la concentración inicial de sustrato  $S_0$  correspondientes a los experimentos realizados al máximo nivel de iluminación.

Se observa en esta figura, que dentro del margen de concentraciones de glucosa utilizado puede considerarse que la velocidad específica es independiente de la misma, creciendo el alga a su velocidad máxima  $\mu_m$ .

Este resultado indica que dentro de un amplio margen de concentraciones la velocidad específica es independiente de la concentración de sustrato ajustándose el proceso de crecimiento a una cinética de orden cero.

Promediando los valores de  $\mu$  obtenidos en los experimentos realizados al máximo nivel de intensidad de iluminación se obtiene un valor de  $\mu_m=0.108 \text{ h}^{-1}$ .

# CRECIMIENTO MIXOTROFICO

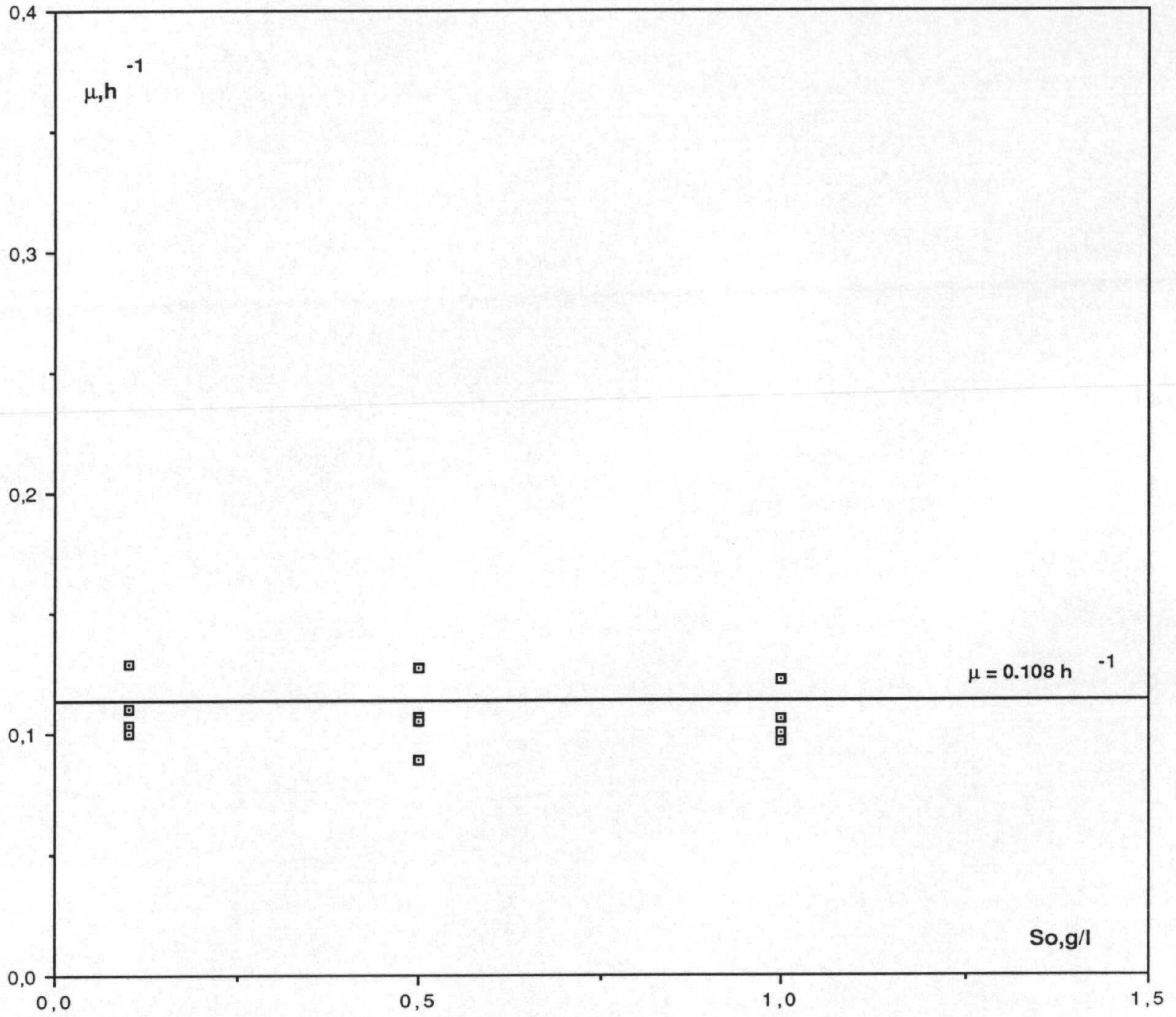


Fig 6.1

Este valor máximo es superior al indicado por Samejima y col. (1958) para el crecimiento mixotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* y *Chlorella ellipsoidea* sobre glucosa a una concentración inicial de 10 g/L de 0.061 h<sup>-1</sup>. Sin embargo, aunque estos autores burbujan aire enriquecido con CO<sub>2</sub> al 5%, las condiciones experimentales de pH y T que utilizan de 5.6 a 5.8 y 25 °C respectivamente están alejadas de sus valores óptimos. Estos autores no especifican el valor de la intensidad de iluminación empleada.

Endo y col. (1972) obtienen para el crecimiento mixotrófico de *Chlorella regularis* S-50 en glucosa bajo una iluminación incidente de 10 Klux una  $\mu_m = 0.37 \text{ h}^{-1}$ , valor alto que justifica por parte de estos autores su clasificación como una cepa de alta velocidad de crecimiento.

Para *Chlorella vulgaris* 222/8k y *Scenedesmus acutus* C-63, Ogawa y col. (1981) investigan la influencia de la concentración inicial de glucosa en los intervalos de 0-100 y 0-10 g/L respectivamente, obteniendo velocidades máximas  $\mu_m$  de 0.198 y 0.048 h<sup>-1</sup>. Estos autores en condiciones experimentales similares a las utilizadas en esta investigación observan una cierta inhibición del crecimiento a partir de concentraciones superiores a 10 y 1 g/L para las dos algas utilizadas, llegando a anularse el crecimiento para *Chlorella* a una concentración de 100 g/L.

Se dispone de poca información sobre constantes de saturación  $K_S$  para *Chlorella*, Komor y col. (1971) determinan en cultivo discontinuo utilizando glucosa, un valor de  $K_S$  comprendida entre 1.8-3.6 mg/L.

El pequeño valor de esta constante se justifica al considerar que está inversamente relacionada con la afinidad del organismo por el sustrato y cae dentro del margen de variación de las constantes de saturación para el crecimiento en glucosa de otros microorganismos por ejemplo: *Escherichia* 6.8 10<sup>-2</sup> mg/L; *Aspergillus* 5.0 mg/L; *Saccharomyces* 25 mg/L.

Si se consideran por una parte estos bajos valores de  $K_S$  y por otra que una célula crece a su máxima velocidad cuando la concentración de sustrato limitante es superior a 10  $K_s$ , es lógico considerar que no exista variación de la

# CRECIMIENTO MIXOTROFICO

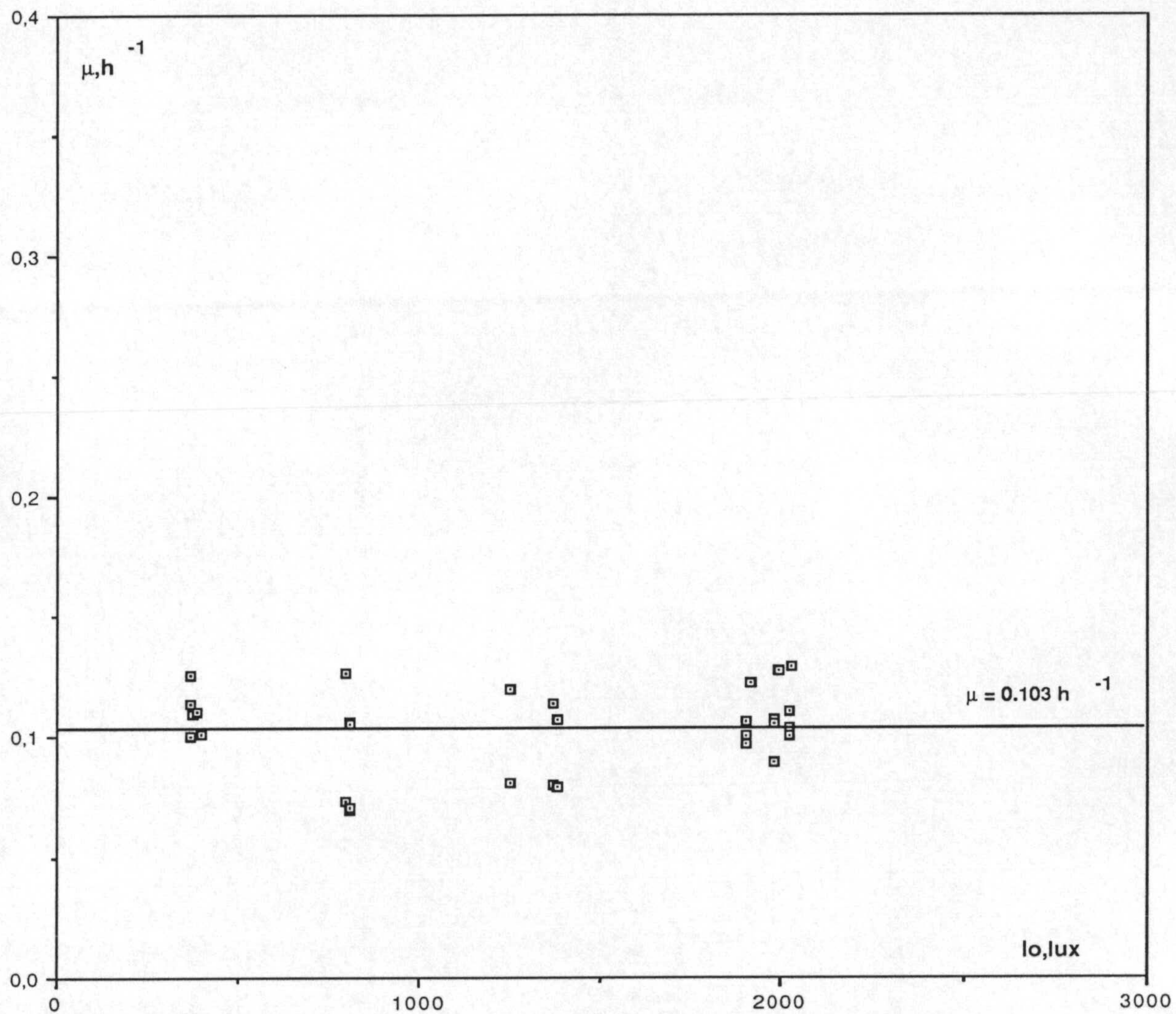


Fig 6.2



velocidad específica de crecimiento con la concentración inicial de sustrato en el intervalo investigado.

Esta misma situación se da a los otros niveles de intensidad de iluminación ensayados. Por tanto, se han promediado los valores de la velocidad específica máxima  $\mu_m$  a los cuatro niveles de intensidad inicial,  $I_o$ , obteniéndose los resultados indicados en la Tabla 6.5.

TABLA 6.5  
CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO  
VELOCIDADES ESPECIFICAS MÁXIMAS

<u><math>I_o, \text{lux}</math></u>	<u><math>\mu_m, \text{h}^{-1}</math></u>
2000	0.108
1300	0.097
800	0.092
400	0.110

#### 6.1.1.1.2 Influencia de la Intensidad de Iluminación.

Los valores de la velocidad específica máxima  $\mu_m$  indicados en la Tabla 6.5 no parecen variar según una tendencia definida con respecto a  $I_o$ . A análogas conclusiones se llega al observar la Figura 6.2, donde se han representado todos

los valores de  $\mu$  indicados en las Tablas 6.1 a 6.4 en función de la intensidad inicial de iluminación,  $I_0$ .

Este hecho, parece indicar que la intensidad de saturación,  $I_S$ , para el crecimiento mixotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* es inferior a 400 lux, valor por debajo del obtenido en este mismo laboratorio para el crecimiento autotrófico de  $I_S=926$  lux.

Este desplazamiento de  $I_S$  a valores inferiores, como ya se ha comentado en la Introducción de esta Memoria, en el caso de crecimiento mixotrófico puede ser debido a una menor necesidad de energía luminosa por el microorganismo, ante la posibilidad de utilizar tanto la luz como el sustrato como fuentes de energía, y fundamentalmente por no ser necesaria la fotosíntesis para el crecimiento celular

Los datos de intensidad de saturación para el crecimiento mixotrófico, de que se dispone información en Bibliografía son muy dispersos variando entre aproximadamente los  $50 \text{ W/m}^2$  (15555 lux) de Follman y cols.(1978) para *Chlorella vulgaris* creciendo en un medio mineral suplementado con glucosa a una concentración de 1g/L y los  $0.8 \mu\text{W/cm}^2$  (2.5 lux) de Karlander y col. (1966 ). Este último valor es inferior al punto de compensación de la fotosíntesis para *Chlorella vulgaris Beijerinck*, creciendo en un medio mineral con glucosa a una concentración de 10 g/L.

Estas observaciones con respecto a la no influencia de la concentración inicial de glucosa y la intensidad inicial de iluminación, sobre la velocidad específica de crecimiento, se han confirmado mediante análisis de varianza.

Para efectuar este análisis se ha utilizado el programa BMDP7D aplicado a la totalidad de los datos de velocidad específica, mediante dos vías la concentración inicial de glucosa y la intensidad inicial de iluminación.

Los resultados de este análisis se indican en la Tabla 6.6. Al nivel de significación elegido de 0.05 se acepta la hipótesis nula de igualdad entre las medias agrupadas por concentración de glucosa  $P = 0.2357$  y por intensidad de

iluminación  $P= 0.6449$ . Asimismo, la velocidad específica,  $\mu$ , es independiente del efecto combinado de ambas variables.  $P= 0.9777$ .

TABLA 6.6

ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE de VARIACIÓN	SUMA de CUADRADOS	GRADOS de LIBERTAD	CUADRADO de la MEDIA	VALOR de F	PROBABILIDAD de la COLA
LUZ	0.0016	3	0.0005	1.55	0.2357
GLUCOSA	0.0003	2	0.0002	0.45	0.6449
INTERACCIÓN	0.0004	6	0.0001	0.18	0.9777
ERROR	0.0062	18	0.0003		

$$\text{MEDIA GLOBAL} = 0.103 \text{ h}^{-1}$$

Por tanto, puede confirmarse la independencia de  $\mu$  con  $S_0$  e  $I_0$  en el rango de variación investigado siendo la velocidad específica máxima media  $\mu_m=0.103 \text{ h}^{-1}$ .

#### 6.1.1.2 Zona de crecimiento exponencial autotrófico

Finalizada la zona de crecimiento exponencial mixotrófico, por agotamiento del sustrato orgánico, se ha observado en los cultivos una zona estacionaria de adaptación, Figuras 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4. La duración de esta zona es función de la intensidad luminosa acortándose al aumentar ésta, por lo que a altas intensidades es apenas perceptible.

Sobre esta zona de adaptación no se ha encontrado ninguna observación en Bibliografía.

A continuación en el cultivo aparece una zona de crecimiento exponencial autotrófico, utilizando las células solo dióxido de carbono y luz como fuentes de carbono y energía respectivamente.

En la Tabla 6.7 se indican las velocidades específicas de crecimiento correspondientes a esta zona, calculadas mediante la ecuación [6.3] y los coeficientes de regresión lineal obtenidos en el ajuste. También se ha incluido la intensidad media de iluminación existente en el cultivo al comienzo de esta zona, calculada mediante la expresión:

$$I_m = \frac{I_o}{14.7 C} (1 - e^{-14.7 C}) \quad [6.4]$$

obtenida en un trabajo previo en este mismo laboratorio, Martínez (1980), y los valores de la concentración inicial de glucosa existente al comienzo del experimento

Estas velocidades específicas se han representado en coordenadas lineales frente a los valores de la intensidad media de iluminación en la Figura 6.3 . Se observa en esta figura que  $\mu$  parece variar linealmente con  $I_m$  hasta aproximadamente unos 800 lux, para a continuación observarse un efecto de saturación.

De los diferentes modelos cinéticos propuestos en Bibliografía para el ajuste de velocidades específicas de crecimiento autotrófico con la intensidad de iluminación se han ensayado los modelos hiperbólico de Tamiya:

TABLA 6.7

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

ZONA AUTOTROFICA

VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

EXPTO	$I_m, \text{lux}$	$S_o, \text{g/L}$	$\mu, \text{h}^{-1}$	$r^2$
M.1	1191.88	0.1	0.0673	0.995
M.2	1076.24	0.1	0.0611	0.999
M.4	1261.54	0.1	0.0591	0.999
M.5	795.67	0.5	0.0451	0.993
TM.5	489.69	0.5	0.0476	0.988
M.7	356.06	0.5	0.0389	0.989
M.8	551.07	1	0.0312	0.997
M.9	420.00	1	0.0485	1
M.11	272.86	1	0.0283	0.998
M.12	402.14	0.1	0.0215	0.994
M.13	805.37	0.1	0.0564	0.999
M.14	269.20	0.5	0.0211	0.991
M.15	439.51	0.5	0.0360	0.994
M.16	204.29	1	0.0344	0.986
M.17	224.90	1	0.0230	0.987
M.25	262.02	0.1	0.0231	0.993
M.27	150.33	0.5	0.0098	0.978
M.29	94.03	1	0.0047	0.917

# MIXOTROFICO, ZONA AUTOTROFICA

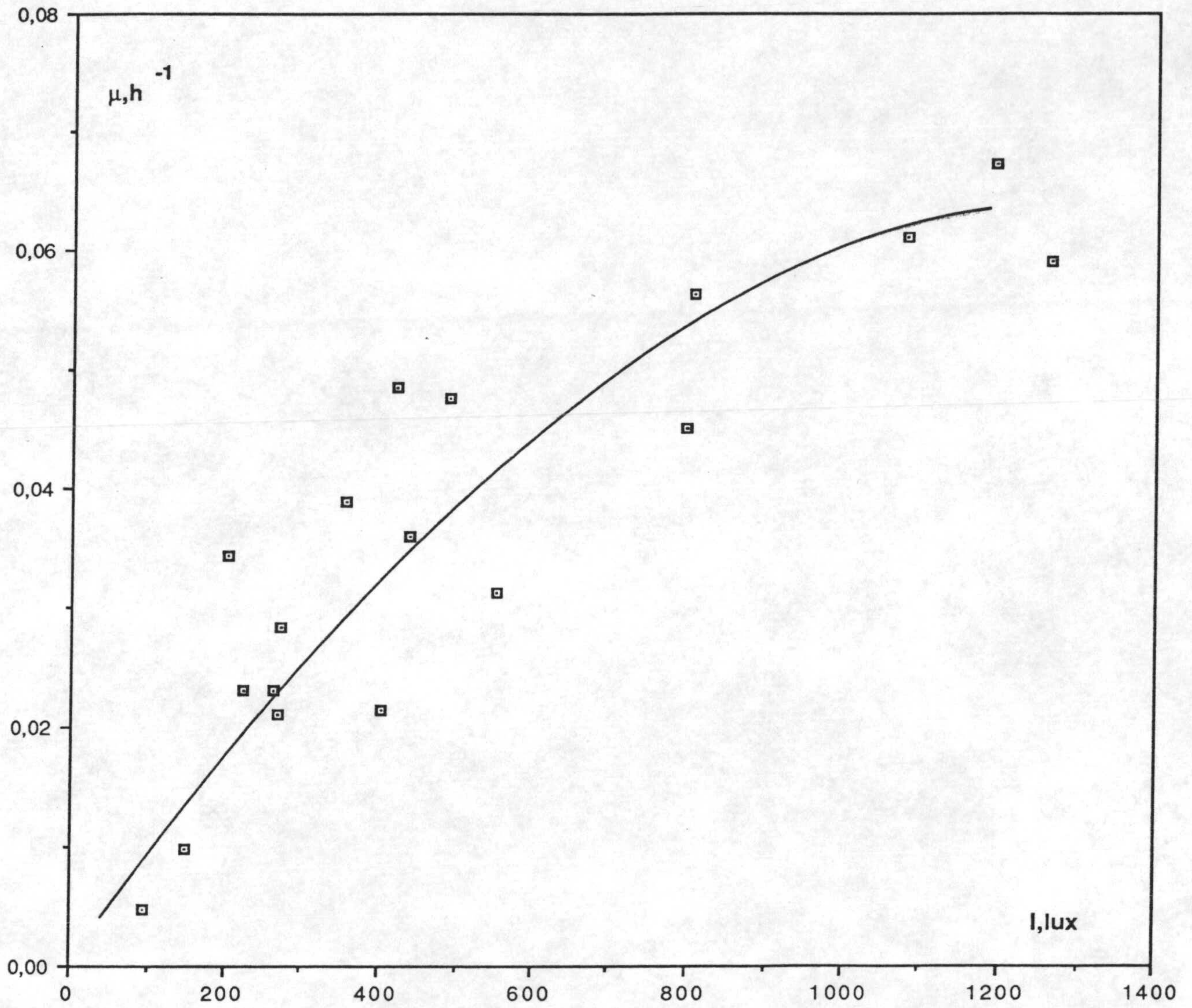


Fig 6.3

$$\mu = \frac{\mu_m I_m}{I_S + I_m} \quad [6.5]$$

y el exponencial

$$\mu = \mu_m (1 - e^{-I/I_S}) \quad [6.6]$$

En ambos casos el ajuste se ha efectuado mediante regresión no lineal, obteniéndose los parámetros que se indican a continuación.

#### MODELO DE TAMIYA

$$\mu_m = 0.103 \text{ h}^{-1} \quad I_S = 793 \text{ lux} \quad \text{SSQ} = 9.838 \cdot 10^{-4}$$

#### MODELO EXPONENCIAL

$$\mu_m = 0.097 \text{ h}^{-1} \quad I_S = 1039 \text{ lux} \quad \text{SSQ} = 6.29 \cdot 10^{-4}$$

Los dos modelos cinéticos reproducen aceptablemente la variación experimental observada, la línea continua en la Figura 6.3 corresponde al modelo exponencial.

El valor de los parámetros  $\mu_m$  e  $I_S$  obtenidos en el ajuste al modelo exponencial son similares a los obtenidos por Camacho y cols. (1983) en cultivo autotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* de:

$$\mu_m = 0.099 \text{ h}^{-1} \quad I_S = 926 \text{ lux}$$

Este hecho parece indicar que al consumirse la glucosa en el cultivo y tras un periodo de adaptación, las células crecen a velocidades equivalentes a las de un cultivo puramente autotrófico, es decir el periodo mixotrófico inicial no ha distorsionado de manera irreversible el aparato fotosintético de las células.

### 6.1.1.3 Comparación de resultados

Con objeto de comparar las velocidades específicas de crecimiento mixotrófico y autotrófico en la Figura 6.4 se han representado conjuntamente.

Puede observarse que a intensidades de iluminación moderadas las velocidades específicas de crecimiento mixotrófico son superiores a las autotróficas, sin embargo, conforme aumenta  $I_m$  ambas velocidades tienden a igualarse, lo que implica que a altas intensidades de iluminación no se obtiene ningún beneficio en el cultivo por la adición de un sustrato orgánico.

A iguales conclusiones llegan Follman y cols. (1978 ) al comparar los crecimientos mixotrófico y autotrófico de *Chlorella vulgaris*, aunque estos autores basan su comparación en un parámetro por ellos definido al que denominan absorción de luz equivalente



# MIXOTROFICO y AUTOTROFICO

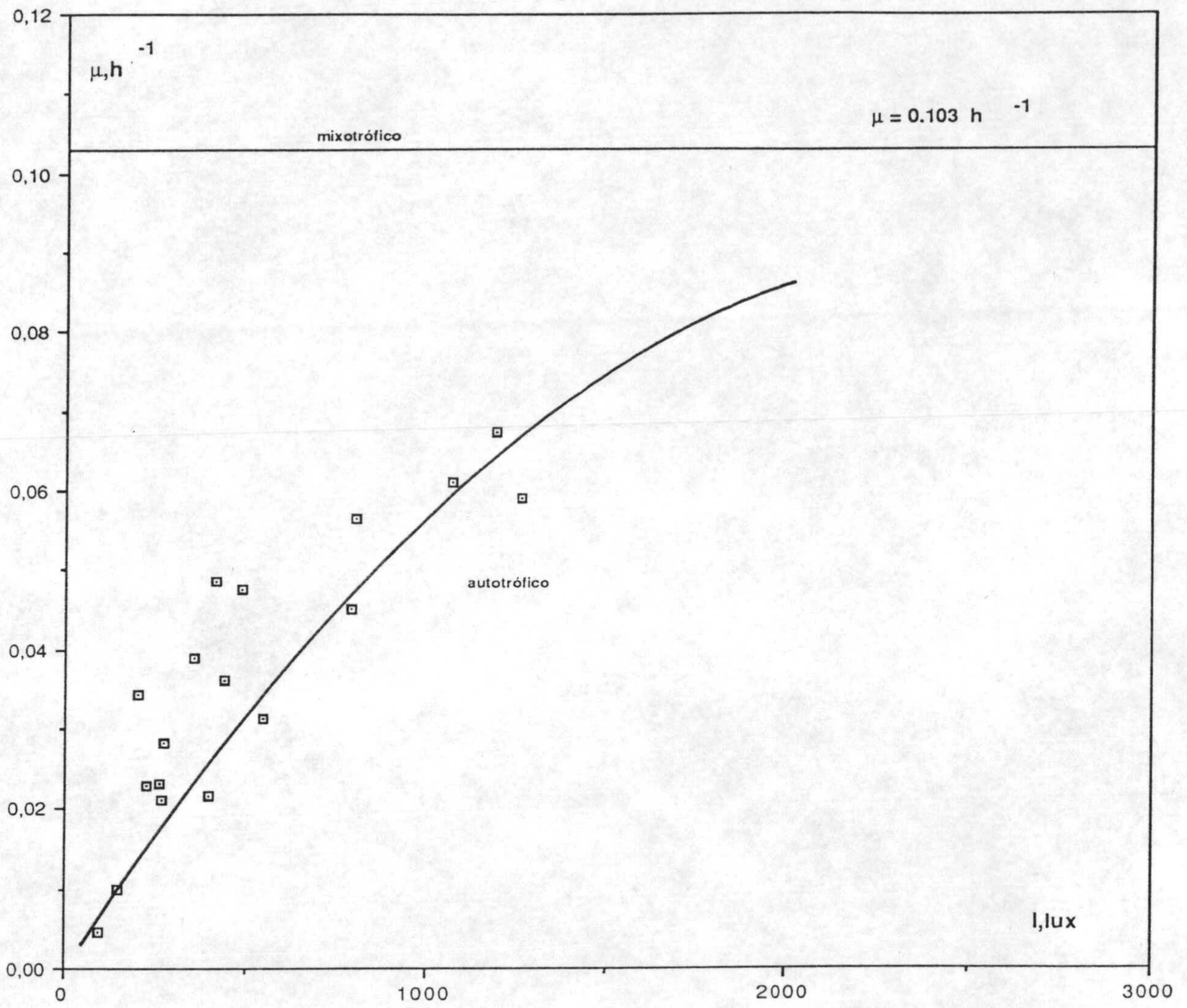


Fig 6.4

### 6.1.2 CONTENIDO EN CLOROFILA

El contenido en clorofila de la biomasa, en el transcurso de cada experimento, se ha determinado por aplicación del método de Porra y col. (1974) descrito en la sección 3.6 de esta Memoria.

En las Tablas 6.8, 6.9, 6.10 y 6.11 se indican las concentraciones de clorofila total, en moles/l, obtenidas por aplicación de la ecuación [3.10] a los experimentos de crecimiento mixotrófico señalados. Se han incluido también los experimentos M.30 a M.32 no considerados en la interpretación del crecimiento. Por otra parte, se ha expresado, la concentración de biomasa, en g/L, en un tiempo igual o próximo al indicado para la clorofila, lo que ha permitido calcular el porcentaje, en % en peso, de clorofila en la biomasa formada a lo largo del experimento. Para transformar la concentración de clorofila de mol/l a g/L se ha usado el peso molecular medio de la clorofila a y b establecido en 900.5 g/mol.

En la Figura 6.5 se han representado los resultados obtenidos clorofila total-tiempo en los experimentos realizados a los niveles de iluminación de 2000 y 1400 lux a las concentraciones iniciales de glucosa de 0.1, 0.5 y 1 g/L.

Se observa que la concentración de clorofila total aumenta de forma continua con el transcurso del experimento, pudiendo ajustarse todos los valores, (de una misma intensidad de iluminación) a una única curva creciente. Resultados similares se han obtenido a las otras intensidades de iluminación ensayadas.

La representación en coordenadas semilogarítmicas de los resultados anteriores, Figura 6.6, pone de manifiesto una variación exponencial, observándose dos zonas diferenciadas que corresponden por comparación con las curvas de crecimiento Figuras 5.1 y 5.2 a las zonas mixotrófica y autotrófica del cultivo.

El contenido en clorofila por unidad de peso seco de células aumenta con el tiempo, alcanzándose los máximos valores cuando el cultivo ha entrado

TABLA 6.8

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.1  $S_o = 0.1 \text{ g/L}$   $I_o = 2027 \text{ lux}$

<u>t,h</u>	<u>P. <math>10^6 \text{ mol/L}</math></u>	<u>C, g/L</u>	<u>% CHL</u>
8	0.685	0.03	1.66
27	4.739	0.08	4.79
32	7.328	0.12	5.27

EXPTO M.2  $S_o = 0.1 \text{ g/L}$   $I_o = 2020 \text{ lux}$

<u>t,h</u>	<u>P. <math>10^6 \text{ mol/L}</math></u>	<u>C, g/L</u>	<u>% CHL</u>
2	0.473	0.015	2.840
22	2.248	0.126	1.607

EXPTO M.4  $S_o = 0.1 \text{ g/L}$   $I_o = 2020 \text{ lux}$

<u>t,h</u>	<u>P. <math>10^6 \text{ mol/L}</math></u>	<u>C, g/L</u>	<u>% CHL</u>
1	0.437	0.015	2.62
24.5	2.218	0.074	2.69
48.5	17.292	0.317	4.91

TABLA 6.8 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.5  $S_o = 0.5$  g/L  $I_o = 1991$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
8	0.742	0.04	1.63
27	4.148	0.15	2.39
32	7.192	0.17	3.70

EXPTO TM.5  $S_o = 0.5$  g/L  $I_o = 1981$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
2	0.508	0.01	2.85
22	2.405	0.14	1.54
25.5	2.703	0.13	1.14

EXPTO M.7  $S_o = 0.5$  g/L  $I_o = 1981$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
1	0.501	0.017	2.654
48.5	16.104	0.414	3.503

TABLA 6.8 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.8  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 1914$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
8	0.783	0.03	1.80
27	4.639	0.34	1.21
32	6.658	0.24	2.44

EXPTO M.9  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 1904$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
2	0.516	0.01	2.52
22	2.642	0.15	1.58
25.5	3.099	0.43	0.81

EXPTO M.11  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 1903$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
1	0.479	0.016	2.69
24.5	1.826	0.146	1.12
48.5	17.626	0.498	3.18

TABLA 6.9

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.12  $S_o = 0.1$  g/L  $I_o = 1386$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
3.75	0.192	0.022	0.78
20	1.997	0.07	2.53
27.5	3.934	0.23	2.88

EXPTO M.13  $S_o = 0.1$  g/L  $I_o = 1386$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
1.5	0.192	0.015	1.15
23.75	3.700	0.085	3.92
47.75	15.992	0.312	4.61
50	16.682	0.321	4.680

EXPTO M.30  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 1386$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
8.75	0.544	0.042	1.16
21.25	3.226	0.098	2.96
24.25	4.233	0.123	3.09
45.75	14.498	0.294	4.441

TABLA 6.9 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.14  $S_o = 0.5$  g/L  $I_o = 1370$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
3.75	0.424	0.022	1.73
20	2.349	0.07	2.74
27.5	4.368	0.41	2.79
45	12.693	0.344	3.323

EXPTO M.15  $S_o = 0.5$  g/L  $I_o = 1370$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
1.5	0.184	0.015	1.10
47.75	16.501	0.427	3.48
50	17.386	0.455	3.44

EXPTO M.31  $S_o = 0.5$  g/L  $I_o = 1370$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
8.75	0.487	0.033	1.32
21.25	1.593	0.128	1.12
24.25	2.547	0.247	0.92
45.75	9.735	0.328	2.67

TABLA 6.9 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.16  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 1255$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
3.75	0.763	0.024	2.86
20	2.109	0.08	2.37
27.5	3.916	0.54	2.29
45	10.825	0.417	2.338

EXPTO M.17  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 1255$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
1.5	0.184	0.015	1.10
47.75	15.606	0.476	2.95
50	16.974	0.510	2.99

EXPTO M.32  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 1255$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
8.75	0.466	0.035	1.19
21.25	2.569	0.085	2.72
24.25	3.086	0.165	1.68
45.75	12.084	0.491	2.216



TABLA 6.10

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.18  $S_o = 0.1$  g/L  $I_o = 814$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
7	0.361	0.02	1.12
22.75	1.564	0.087	1.61
31	2.777	0.09	2.68
48.5	5.288	0.12	4.25

EXPTO M.20  $S_o = 0.5$  g/L  $I_o = 809$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
7	0.222	0.03	0.55
22.75	1.772	0.181	0.88
31	2.855	0.18	1.42
48.5	5.643	0.63	3.11

EXPTO M.22  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 802$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
7	0.515	0.03	1.40
22.75	1.845	0.319	0.52
31	2.228	0.28	0.70
48.50	4.101	0.199	1.85

TABLA 6.11

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.24  $S_o = 0.1$  g/L  $I_o = 373$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
7.50	0.394	0.026	1.36
23.00	1.033	0.071	1.31
47.00	1.283	0.079	1.46

EXPTO M.25  $S_o = 0.1$  g/L  $I_o = 370$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
1	0.452	0.01	2.54
21	1.671	0.07	2.06
47.50	3.539	0.080	3.98
72.50	6.528	0.121	4.85

TABLA 6.11 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.26  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$   $I_o = 389 \text{ lux}$

t,h	P. $10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
7.50	0.458	0.034	1.21
23.00	1.355	0.168	0.72
47.00	1.809	0.174	0.93

EXPTO M.27  $S_o = 0.5 \text{ g/L}$   $I_o = 395 \text{ lux}$

t,h	P. $10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
1	0.466	0.01	2.46
21	1.238	0.11	0.99
47.50	4.954	0.164	2.72
72.50	8.598	0.207	3.74

TABLA 6.11 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO M.28  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 367$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
7.50	0.465	0.038	1.10
23.00	1.400	0.317	0.39
47.00	1.648	0.296	0.50

EXPTO M.29  $S_o = 1$  g/L  $I_o = 370$  lux

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
1	0.431	0.01	2.28
21	1.495	0.13	1.01
47.50	6.033	0.262	2.07
72.50	9.627	0.289	3.00

# CRECIMIENTO MIXOTROFICO

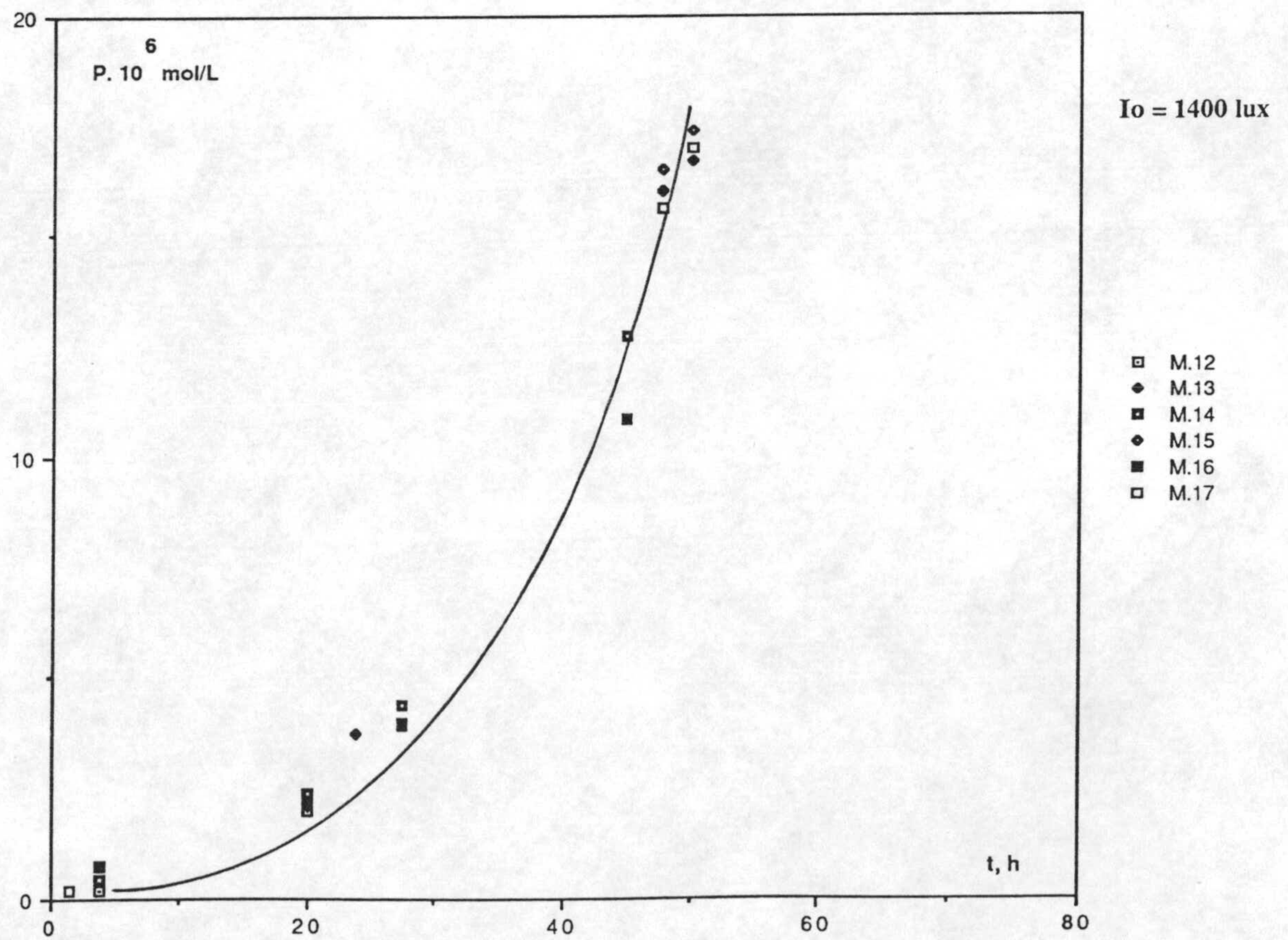
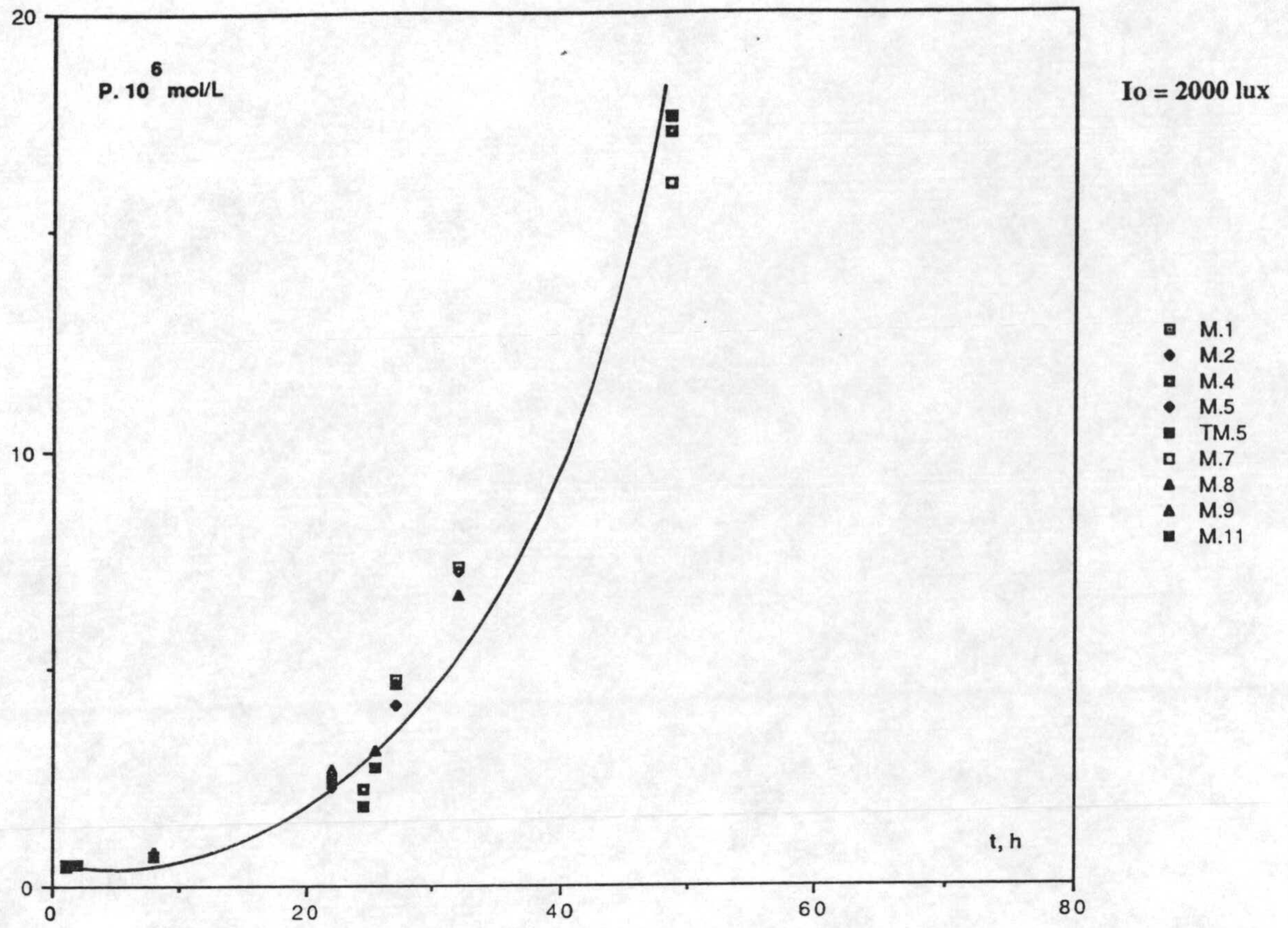


FIG. 6.5

# CRECIMIENTO MIXOTROFICO

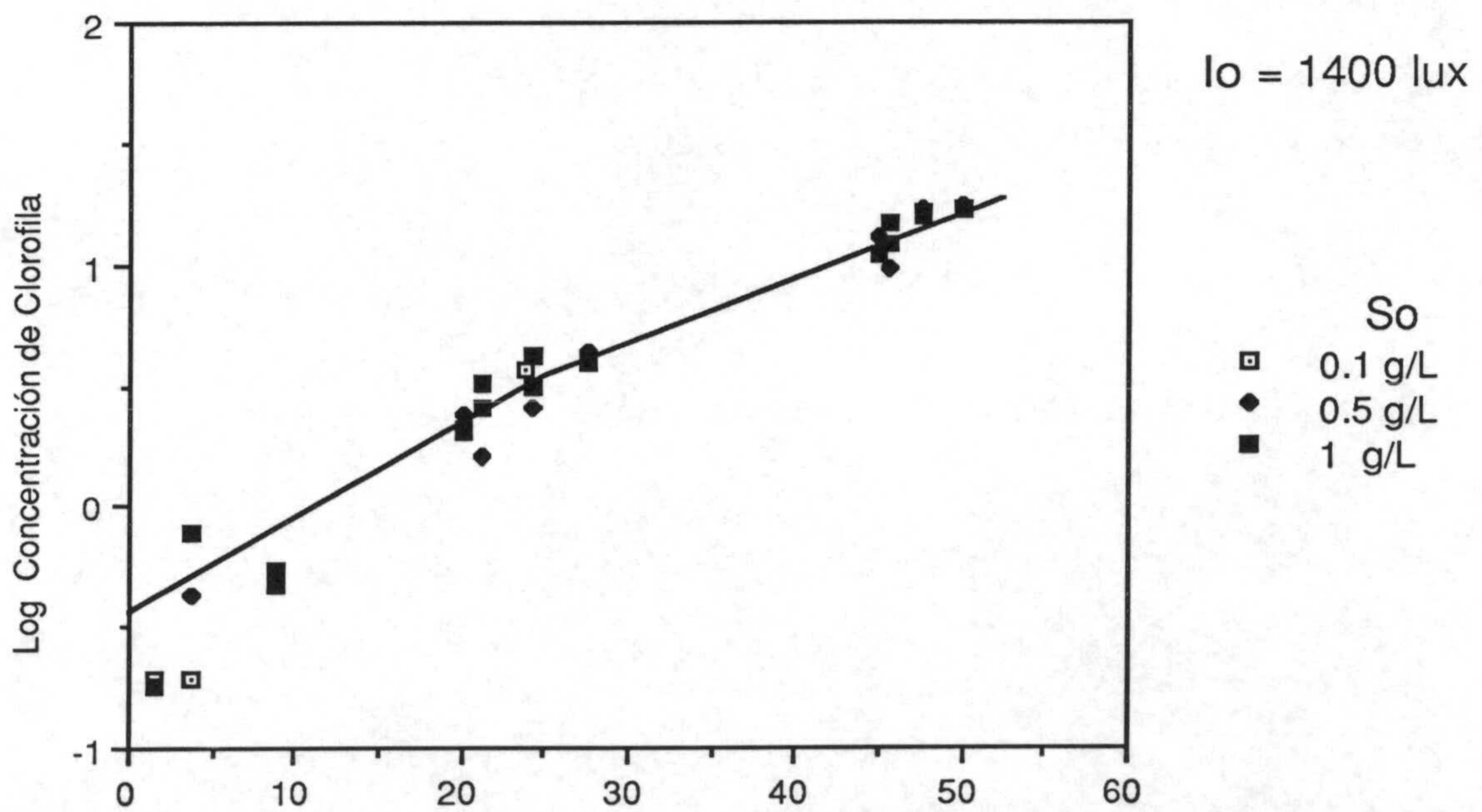
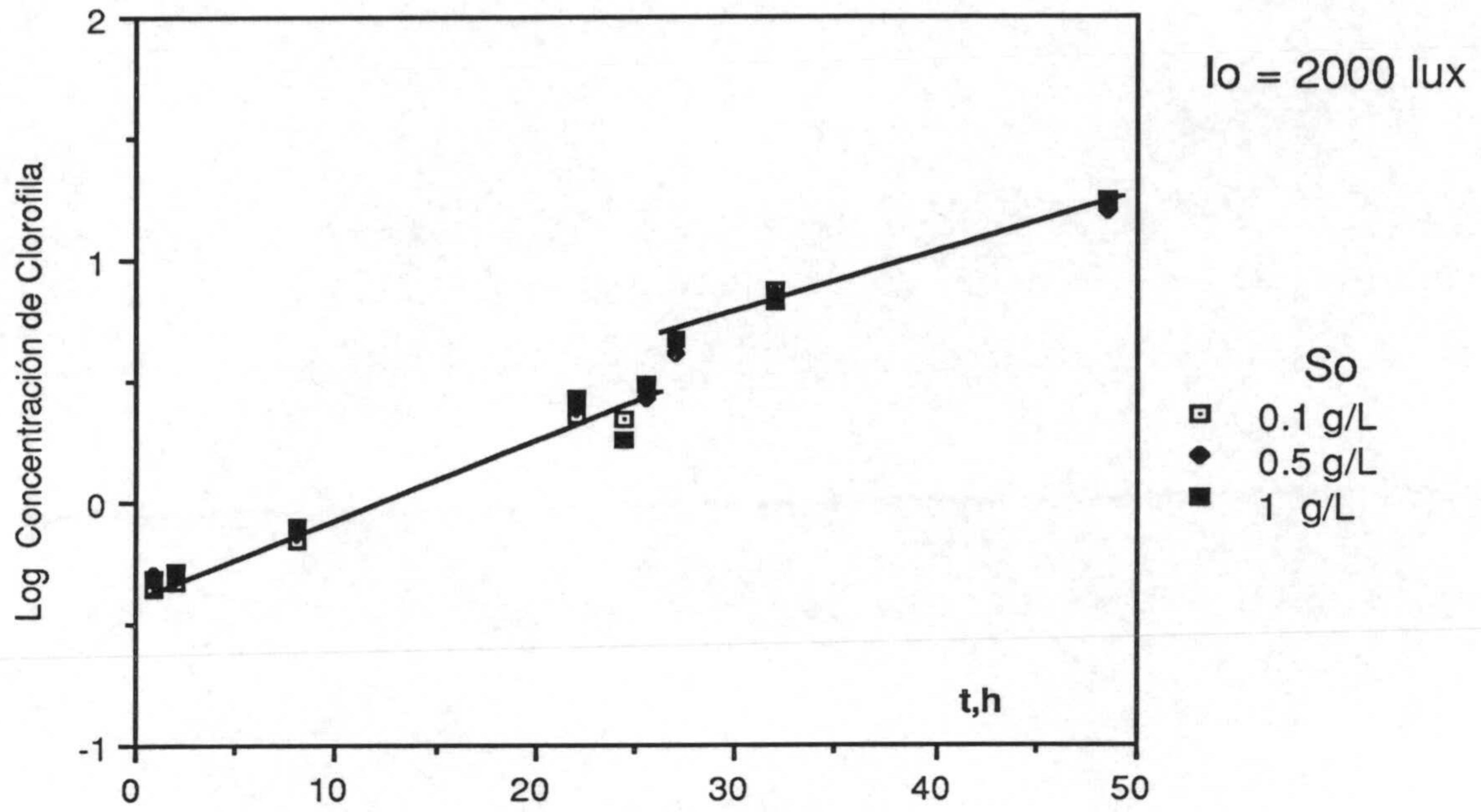


FIG. 6.6

claramente en la zona autotrófica de crecimiento.

Las observaciones anteriores están de acuerdo cualitativamente con los resultados de Endo y col(1972) y Ogawa y col(1981). Los primeros autores indican un aumento del contenido en clorofila/célula con el tiempo en cultivos mixotróficos de *Chlorella regularis* S-50 utilizando glucosa como sustrato orgánico. Los segundos comparan el contenido en clorofila de *Chlorella vulgaris* 211/8H crecida autotróficamente y mixotróficamente obteniendo un valor significativamente superior en las primeras condiciones.

Este último hecho justifica el ligero descenso que se observa en el % CHL al comienzo de algunos experimentos ya que las células del inóculo se han cultivado siempre en condiciones autotróficas.

En los cálculos realizados no se ha diferenciado entre clorofila a y b, estando los valores obtenidos del % CHL(a+b) en todos los casos dentro del margen de variación del 0.01% al 6% indicado por Milner(1953) para *Chlorella pyrenoidosa*.

#### 6.1.2.1 Zona de crecimiento exponencial mixotrófico

Con objeto de cuantificar las observaciones experimentales y determinar la influencia de la concentración del sustrato orgánico y la intensidad de iluminación sobre la formación de clorofila se han calculado las velocidades específicas de síntesis de clorofila.

Esta velocidad específica se define por:

$$q_p = \frac{1}{C} \frac{dP}{dt} \quad [6.8]$$

y representa la velocidad de formación de clorofila por unidad de concentración celular.

Reordenando la ecuación [6.8], el producto, P, formado, durante el crecimiento en cultivo discontinuo, en un tiempo ,dt, infinitamente pequeño vendrá dado por:

$$dP = q_p C dt \quad [6.9]$$

e integrando resulta

$$\int_{P_0}^P dP = \int_0^t q_p C dt \quad [6.10]$$

si esta ecuación se aplica a la fase exponencial de crecimiento admitiendo que  $q_p$  es constante y teniendo en cuenta que la función que liga la concentración de biomasa con el tiempo es:

$$C = C_0 e^{\mu t} \quad [6.11]$$

La integral dada por [6.10] puede resolverse quedando en la forma:

$$P = P_0 + \frac{q_p C_0}{\mu} (e^{\mu t} - 1) \quad [6.12]$$

El ajuste de los valores  $P - e^{\mu t}$ , mediante regresión lineal permite determinar la velocidad específica de formación de producto,  $q_p$ .

En la Figura 6.7 se ha representado esta variación lineal para los experimentos seleccionados a título de ejemplo y en la Tabla 6.12 se indica la velocidad específica de síntesis de clorofila junto con el coeficiente de regresión lineal obtenido en los ajustes. Este tratamiento se ha efectuado conjuntamente para aquellos experimentos realizados en similares condiciones ambientales, habiéndose



# CRECIMIENTO MIXOTROFICO

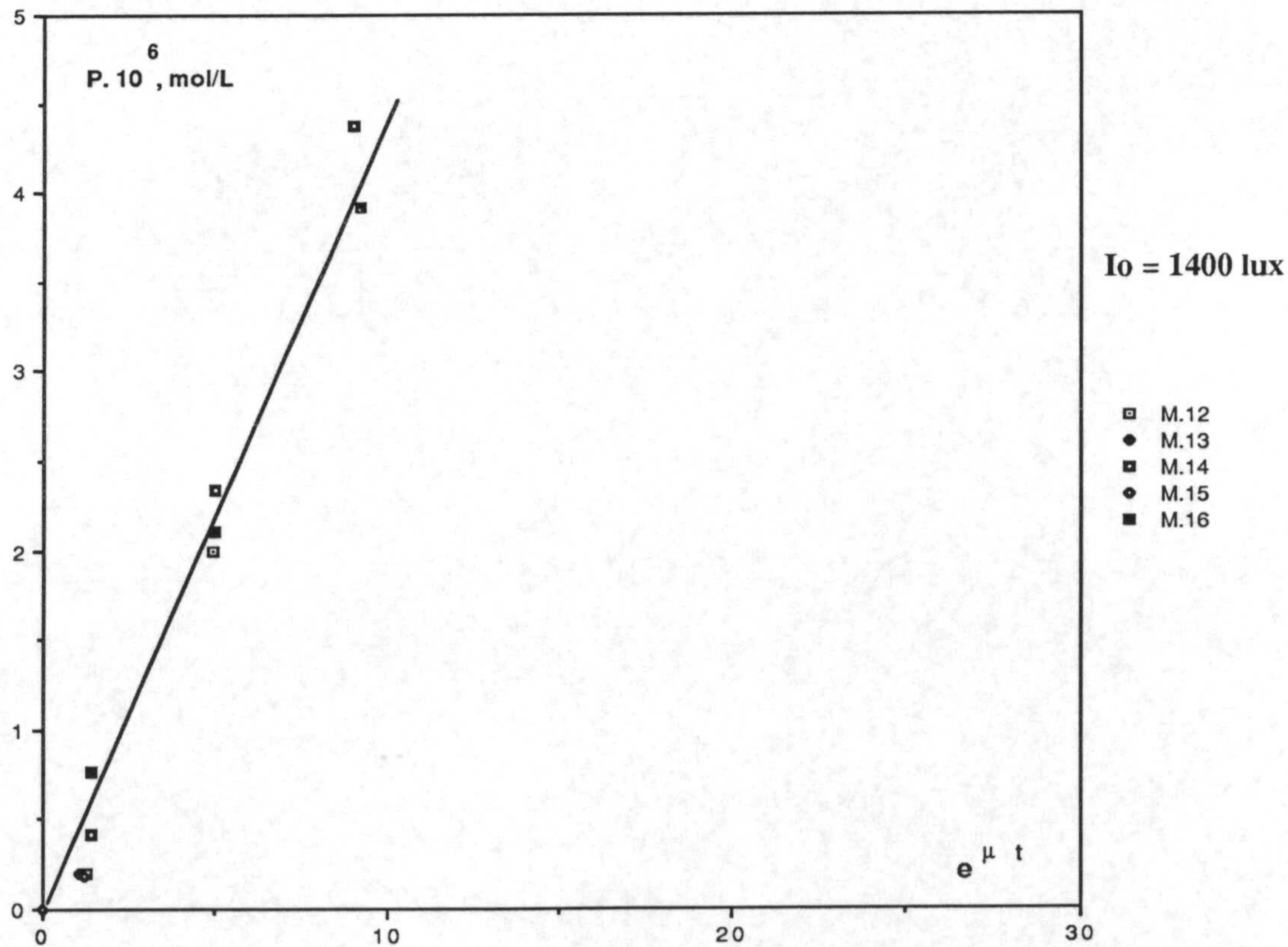
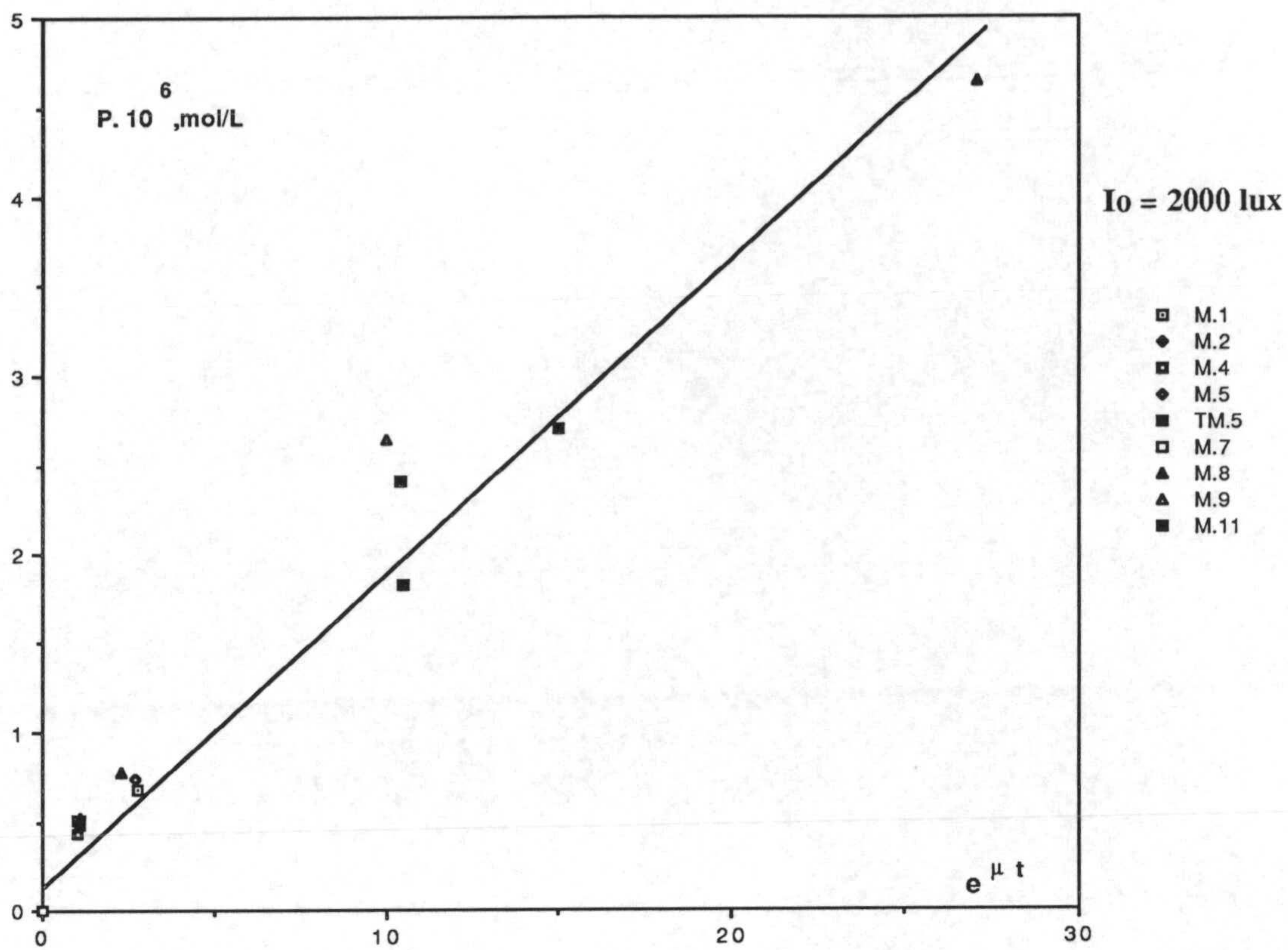


FIG. 6.7

TABLA 6.12

Zona exponencial mixotrófica

VELOCIDADES ESPECIFICAS DE SINTESIS DE CLOROFILA

$I_0, \text{lux}$	$S_0, \text{g/L}$	$q_p, \frac{\text{mol clorofila}}{\text{g biomasa h}} \cdot 10^6$	$r^2$
2022	0.1	1.3453	0.996
1984	0.5	1.2790	0.971
1910	1	1.1525	0.965
<b>1.2589 valor medio</b>			
1386	0.1	3.723	0.998
1370	0.5	3.121	0.998
1255	1.5	2.611	0.984
<b>3.1151 valor medio</b>			
395	0.5	0.8295	0.974
369	1	0.9196	0.988
<b>0.8746 valor medio</b>			

promediado las velocidades específicas de crecimiento, las concentraciones iniciales de biomasa y las intensidades de iluminación incidente de los experimentos individuales.

A los dos niveles superiores de intensidad de iluminación parece existir una ligera tendencia a disminuir  $q_p$  con el aumento de la concentración inicial de glucosa en el cultivo, situación que se invierte en el nivel mínimo. Este último hecho, junto a que los valores menores de  $q_p$  son los obtenidos con menor coeficiente de regresión no permiten asegurar el descenso de  $q_p$  con  $S_0$ . Así, se ha promediado a cada nivel de intensidad de iluminación la velocidad específica de síntesis de clorofila expresada en mol clorofila/g biomasa h, valores que también se han incluido en la Tabla 6.12.

El ajuste por regresión lineal de los valores experimentales  $P - e^{\mu t}$  a los dos niveles máximos de iluminación conduce a obtener las líneas continuas trazadas en la Figura 6.7, que reproducen aceptablemente la variación experimental observada a las tres concentraciones de glucosa utilizadas.

Shugarman y col.(1966) al comparar los momentos iniciales de un cultivo autotrófico y un cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris Beijerinck* detectan que la presencia de glucosa interfiere la síntesis de clorofila.

Así en las primeras 24 h del cultivo mixotrófico a pesar de haber un crecimiento considerablemente superior al autotrófico la clorofila formada fue la mitad, lo que originó un contenido por célula pequeño. Sin embargo, el desprendimiento de oxígeno por mg de clorofila fué idéntico en ambos cultivos, lo que indica que la glucosa no ejerce un efecto destructivo sobre el cloroplasto. Estos autores, aunque sin comprobar, consideran que la glucosa suprime la formación de enzimas específicas para la síntesis de clorofila y que esta acción es solo temporal ya que a las 48 h de crecimiento el nivel de clorofila era similar al del cultivo control autotrófico.

Por otra parte estos autores consideran que esta inhibición temporal es independiente de la concentración inicial de glucosa en el rango por ellos estudiado de 1 a 5 g/L.

Los resultados obtenidos por estos autores son consistentes con los de esta investigación, pudiendo ampliarse este intervalo a 0.1 g/L. La razón de que distintas concentraciones de glucosa no interfieran la síntesis de clorofila puede ser la misma velocidad de entrada de la glucosa en la célula, ya que en el rango mencionado no se observa variación en la velocidad de crecimiento.

Con respecto a la intensidad de iluminación se observa la existencia de un máximo en la velocidad específica de síntesis de clorofila al disminuir la intensidad incidente.

Este hecho coincide cualitativamente con las observaciones generales de que el aparato fotosintético de las células es lábil tanto a altas como a bajas intensidades de iluminación.

Aunque la información bibliográfica a este respecto en cultivo mixotrófico es escasa Shugarman y col(1966) comprueban en experimentos discontinuos que la velocidad de síntesis de clorofila depende de la edad de la células a través de la adaptación de las mismas a distintas intensidades de iluminación.

Así, cultivos iniciados con células procedentes de un cultivo control a las 1, 48 y 72 h del mismo, presentan velocidades de síntesis de clorofila que pasan por un máximo. Esta variación consideran los autores es función de las intensidades luminosas a que han estado sometidas las células en el cultivo control, es decir, intensidades altas a 1, medias a 48, bajas a 72 h.

Parece por tanto evidente, que en condiciones mixotróficas el alga se adapta a diferentes intensidades de iluminación variando la velocidad de síntesis del pigmento fotosintético: clorofila.

### 6.1.3 CONSUMO DE SUSTRATO

El consumo de glucosa se ha determinado por aplicación de los métodos de Somogyi -Nelson y Summer-Miller, descritos en el apartado tres de esta Memoria.

En la Tabla 6.13 se indican los valores de la concentración de glucosa residual, S, expresada en mg/L, frente al tiempo, t, en horas para los experimentos de crecimiento mixotrófico. Cada grupo de resultados recoge los valores experimentales correspondientes a cultivos realizados en iguales condiciones ambientales, la primera columna identifica cada experimento. Estos resultados se han representado en coordenadas semilogarítmicas en las Figuras 6.8, 6.9 y 6.10.

#### 6.1.3.1 Velocidad específica de consumo de sustrato

La velocidad específica de consumo de sustrato o consumo metabólico se puede expresar por la ecuación:

$$-\frac{1}{C} \frac{dS}{dt} = q_s \quad [6.13]$$

que aplicada a la zona de crecimiento exponencial e integrada queda:

$$S = S_0 - \frac{q_s C_0}{\mu} (e^{\mu t} - 1) \quad [6.14]$$

análoga a [6.12] obtenida para el cálculo de la velocidad específica de formación de clorofila.

TABLA 6.13

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

	<u>Expto.</u>	<u>t h</u>	<u>S mg/L</u>	<u>S<sub>t</sub> mg/L</u>
		0	0	89.74
Io = 2000 lux	M.3	1	89.90	89.22
	M.2	1.5	88.90	88.95
So=100 mg/L	M.3	12	70.90	77.96
Co = 0.011 g/L	M.2	13	67.90	76.13
μ= 0.1070 h <sup>-1</sup>	M.4	22.25	49.90	45.50

<u>Expto.</u>	<u>t h</u>	<u>S mg/L</u>	<u>S<sub>t</sub> mg/L</u>	
	0	500	489.59	
M.5	3	481.9	485.94	Io= 2000 lux
M.5	4	464.9	484.44	
TM.5	22	401.9	396.53	So = 500 mg/L
M.7	22.25	416.9	393.72	Co = 0.015 g/L
M.7	24.50	409.9	364.76	μ = 0.1079 h <sup>-1</sup>
TM.5	25.25	292.9	353.43	

	<u>Expto.</u>	<u>t h</u>	<u>S mg/L</u>	<u>S<sub>t</sub> mg/L</u>
		0	1000	959.41
Io = 2000 lux	M.10	1	961	958.66
	M.8	3	949.5	956.88
	M.8	4	949.5	955.84
So = 1000 mg/L	M.10	12	951	942.06
Co = 0.014 g/L	M.10	21.25	893	902.11
μ = 0.1055 h <sup>-1</sup>	M.9	22	900.9	896.83
	M.11	22.25	869.9	894.97
	M.11	24.50	864.9	875.88
	M.11	46.50	48.9	45.96

TABLA 6.13 (Continuación)

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

	<u>Expto.</u>	<u>t h</u>	<u>S mg/L</u>	<u>S<sub>t</sub> mg/L</u>
I <sub>o</sub> = 1400 lux		0	1.00	99.22
S <sub>o</sub> = 100 mg/L	C.7A	1.25	95.90	97.13
C <sub>o</sub> = 0.012 mg/L	M.12	20	65.90	63.14
μ = 0.0792 h <sup>-1</sup>	M.12	23	54.90	57.21

---

<u>Expto.</u>	<u>t h</u>	<u>S mg/L</u>	<u>S<sub>t</sub> mg/L</u>	
	0	500	485.02	I <sub>o</sub> = 1400 lux
C7B	1.25	474.5	481.84	S <sub>o</sub> = 500 mg/L
C7B	21.25	226.9	272.45	C <sub>o</sub> = 0.015 g/L
M.15	22.75	266.9	228.99	μ = 0.1139 h <sup>-1</sup>

---

	<u>Expto.</u>	<u>t h</u>	<u>S mg/L</u>	<u>S<sub>t</sub> mg/L</u>
I <sub>o</sub> = 1400 lux		0	1000	1011.80
S <sub>o</sub> = 1000 mg/L	M.17	13.5	957.21	940.73
C <sub>o</sub> = 0.015 g/L	M.17	22.75	756.9	761.58
μ = 0.1194 h <sup>-1</sup>				

TABLA 6.13 (Continuación)

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

	<u>Expto.</u>	<u>t h</u>	<u>S mg/L</u>	<u>S<sub>t</sub> mg/L</u>
I <sub>o</sub> = 400 lux		0	100	90.91
S <sub>o</sub> = 100 mg/L	M.25	9.75	66.9	78.72
C <sub>o</sub> = 0.014 g/L	M.25	21	40.9	38.17
μ = 0.0997 h <sup>-1</sup>				

---

<u>Expto.</u>	<u>t h</u>	<u>S mg/L</u>	<u>S<sub>t</sub> mg/L</u>	
	0	500	522.08	I <sub>o</sub> = 400 lux.
M.26	9.5	467	471.29	S <sub>o</sub> = 500 mg/L
M.27	21	345.9	284.24	C <sub>o</sub> = 0.014 g/L
M.27	25.75	77.40	112.69	μ = 0.1042 h <sup>-1</sup>

---

	<u>Expto.</u>	<u>t h</u>	<u>S mg/L</u>	<u>S<sub>t</sub> mg/L</u>
		0	1000	1037.80
I <sub>o</sub> = 400 lux	M.28	9.5	930	968.80
S <sub>o</sub> = 1000 mg/L	M.29	9.75	952.9	965.76
C <sub>o</sub> = 0.015 g/L	M.29	21	794.9	680.81
μ = 0.1157 h <sup>-1</sup>	M.29	25.75	474.9	394.05
	M.29	28	86.9	192.38



# CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO

Intensidad de iluminación máxima

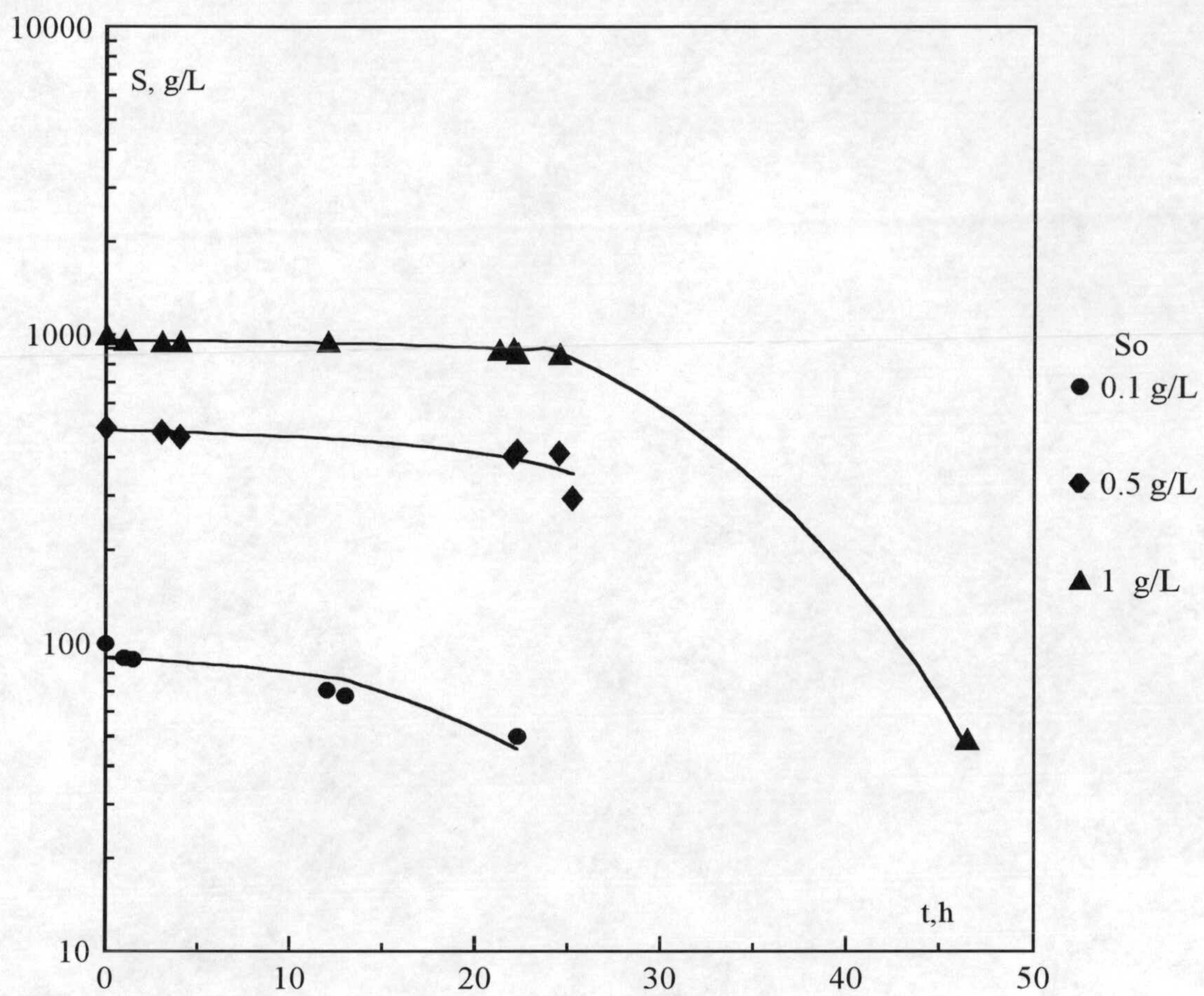


FIG. 6.8

# CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO

Intensidad de iluminación intermedia

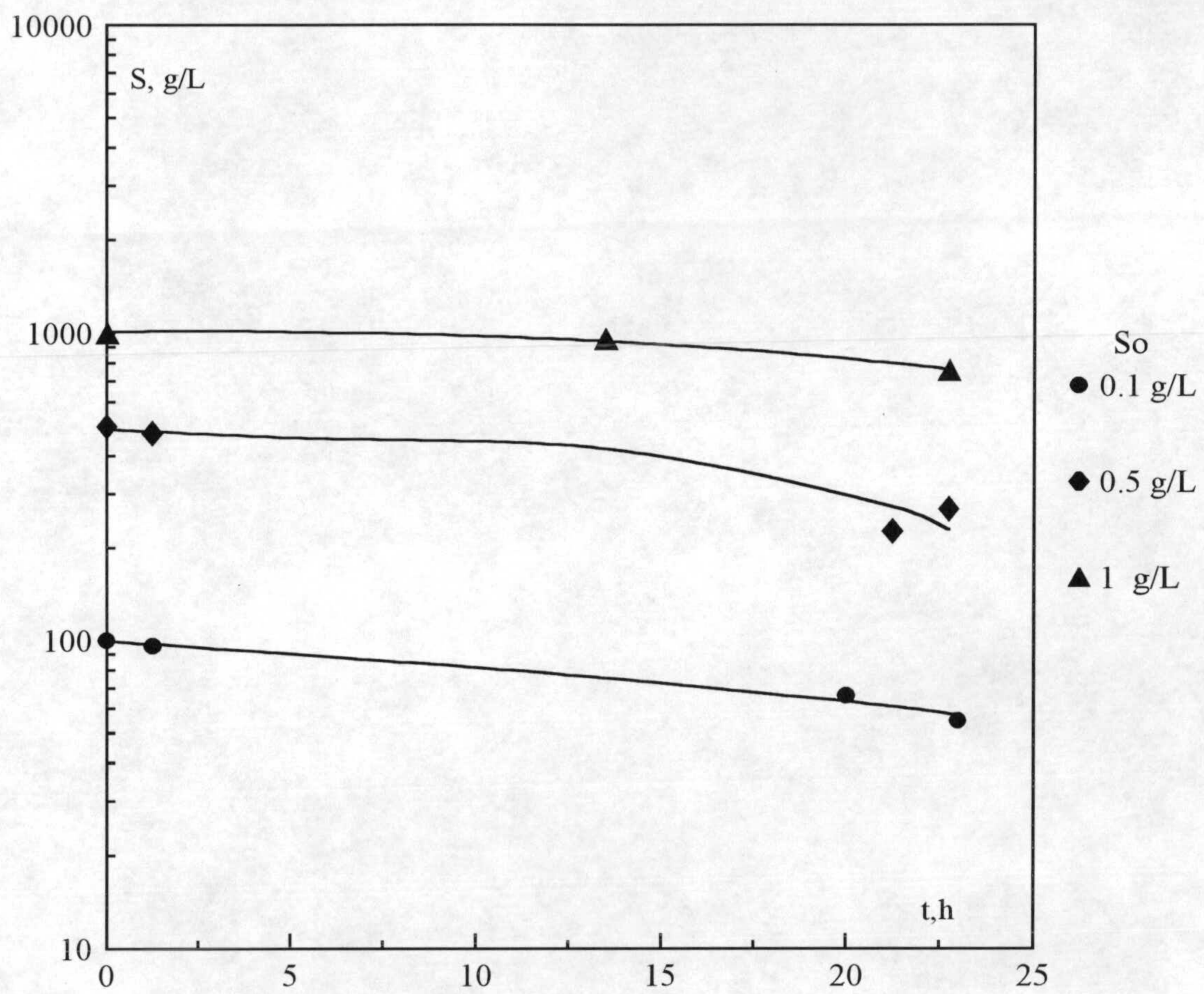


FIG. 6.9

# CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO

Intensidad de iluminación mínima

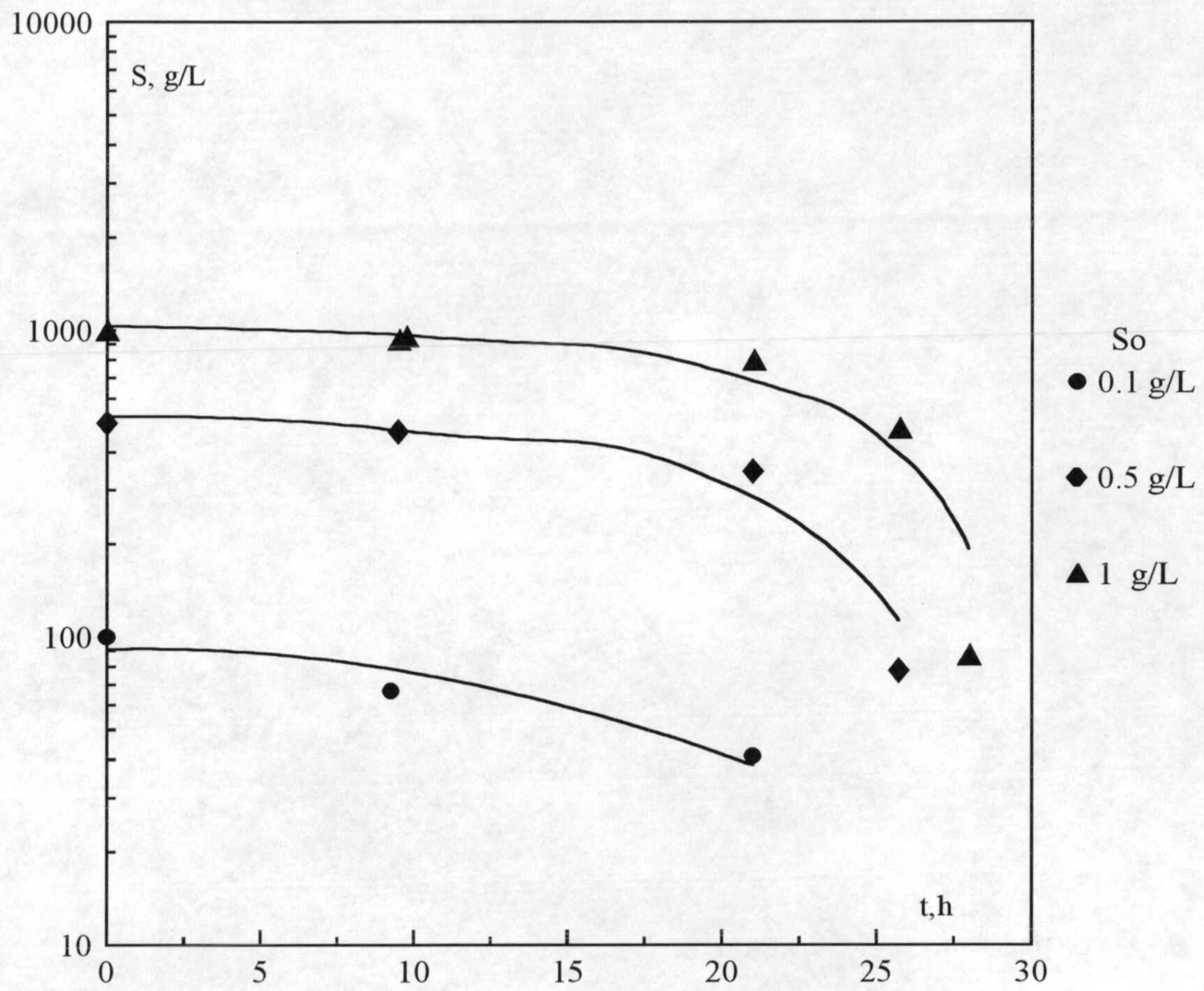


FIG. 6.10

El ajuste de los valores  $S_0 - S$  y  $e^{\mu_m t}$  a la ecuación [6.14] se ha efectuado mediante regresión lineal.

Los valores teóricos  $S_t - t$  proporcionados por la ecuación [6.14] se han incluido en la Tabla 6.13 y con ellos se han trazado las líneas continuas de las Figuras 6.8 ,6.9 y 6.10 . Puede apreciarse en estas figuras una buena reproducción de la variación experimental.

En la Tabla 6.14 se indican los valores obtenidos para la velocidad específica de consumo de glucosa y los coeficientes  $p-r^2$  obtenidos en el ajuste.

Para un mismo nivel de intensidad de iluminación los valores de  $q_s$  no parecen variar significativamente con la concentración de glucosa. A 400 lux hay un valor discordante pero obtenido con bajo coeficiente  $p-r^2$  por ello se han promediado los valores de  $q_s$  ,valores medios que también se indican en la Tabla 6.14

Estos valores medios ponen claramente de manifiesto un aumento de la velocidad de consumo metabólico,  $q_s$  , al disminuir la intensidad de iluminación incidente. Este hecho puede ser una respuesta de la célula ante la disminución de energía luminosa con una mayor utilización metabólica del sustrato orgánico.

Estos valores de  $q_s$  continúan aumentando al disminuir  $I_0$ , ya que Sánchez (1986) al utilizar la misma microalga en oscuridad obtiene un valor de  $q_s$  de 365 mg glucosa/ g biomasa h cuando la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo es de 0.25 g/L.

Endo y col.(1977b), en el crecimiento heterotrófico en continuo de *Chlorella regularis* S-50 determinan una velocidad específica de consumo de sustrato de 345 mg acetato/g biomasa h cuando la velocidad de dilución en el cultivo era de  $D = 0.102 \text{ h}^{-1}$ . Aiba y col (1981) obtienen en el crecimiento mixotrófico en continuo de *Chlorella regularis* a 4.95 klux valores de  $q_s$  de 154 y 212 mg glucosa/g biomasa h para velocidades de dilución de 0.085 y 0.116  $\text{h}^{-1}$  respectivamente y para el crecimiento heterotrófico valores de 207 y 326 mg glucosa/g biomasa h para  $D = 0.045$  y  $0.11 \text{ h}^{-1}$  .Para cada crecimiento se observa

un aumento en  $q_s$  al aumentar la velocidad de dilución y un aumento del crecimiento mixotrófico al heterotrófico es decir al disminuir la intensidad de iluminación.

TABLA 6.14

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

<u>Io, lux</u>	<u>So, mg/L</u>	<u><math>q_s</math> mg/g h</u>	<u>p - r<sup>2</sup></u>
2000	100	43.85	0.856
	500	68.74	0.761
	1000	51.34	0.996
	valor medio	54.64	
1400	100	138.76	0.990
	500	157.46	0.940
	1000	141.00	0.987
	valor medio	145.74	
400	100	52.78	0.870
	500	223.53	0.950
	1000	265.90	0.950
	valor medio	180.74	

## 6.1.4 RENDIMIENTOS

### 6.1.4.1 Rendimiento en biomasa.

El rendimiento global en biomasa se ha determinado al finalizar la zona exponencial una vez agotada la glucosa en el medio de cultivo, mediante la expresión [6.15]

$$Y = \frac{C_m - C_0}{S_0} \quad [6.15]$$

donde  $C_m$  representa la concentración de biomasa en g/L alcanzada al consumirse la glucosa,  $C_0$  es la concentración de biomasa obtenida por inoculación al comienzo del cultivo y  $S_0$  es la concentración de glucosa inicial. En algunos experimentos se ha estimado  $C_m$  a partir del punto de corte resultante de extrapolar las zonas de crecimiento exponencial mixotrófica y autotrófica. Por tanto, el rendimiento del cultivo mixotrófico calculado mediante la ecuación [6.15] incluye parte de la fase de adaptación que une ambas zonas de crecimiento exponencial y estará influido parcialmente por el crecimiento autotrófico posterior.

Los valores de rendimiento global,  $Y$ , g biomasa seca/ g glucosa se indican en la Tabla 6.15 para cada concentración inicial de glucosa e intensidad inicial de iluminación. En esta tabla para un mismo valor de  $S_0$  e  $I_0$  se han incluido varios experimentos con objeto de determinar el valor medio del rendimiento másico  $Y$ , así, se indican la letra y número de identificación de cada uno de ellos y los correspondientes valores de  $C_m$  y  $C_0$ .

La necesidad del cálculo de los valores medios de  $Y$ , Tabla 6.15, se justifica por la dificultad de evaluación de  $C_m$  en un cultivo discontinuo. Estos rendimientos medios se han representado en la Figura 6.11 frente a la intensidad inicial de iluminación  $I_0$ .

TABLA 6.15

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

RENDIMIENTOS EN BIOMASA

EXPTO..	S <sub>0</sub> , g/L	I <sub>0</sub> ,lux	C <sub>m</sub> , g/L	C <sub>0</sub> , g/L	Y, g/g
M.2	0.1	2020	0.129	0.012	1.17
M.3	0.1	2020	0.098	0.010	0.88
M.4	0.1	2020	0.095	0.012	0.83
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.96</b>
M.12	0.1	1386	0.123	0.012	1.11
M.13	0.1	1386	0.117	0.014	1.03
			<b>Valor medio</b>	=	<b>1.07</b>
M.18	0.1	814	0.093	0.013	0.80
M.19	0.1	814	0.085	0.015	0.70
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.75</b>
M.24	0.1	373	0.071	0.011	0.60
M.25	0.1	370	0.073	0.014	0.59
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.595</b>
TM.5	0.5	1981	0.351	0.013	0.676
M.7	0.5	1981	0.377	0.015	0.724
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.70</b>
M.14	0.5	1370	0.344	0.015	0.658
M.15	0.5	1370	0.301	0.015	0.572
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.615</b>
M.20	0.5	809	0.181	0.018	0.326
M.21	0.5	809	0.234	0.018	0.432
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.379</b>
M.26	0.5	389	0.163	0.015	0.296
M.27	0.5	395	0.232	0.014	0.436
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.366</b>
M.10	1	1904	0.392	0.011	0.381
M.11	1	1904	0.474	0.015	0.459
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.420</b>
M.16	1	1255	0.417	0.022	0.395
M.17	1	1255	0.376	0.015	0.361
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.378</b>
M.22	1	802	0.302	0.014	0.288
M.23	1	802	0.355	0.020	0.335
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.315</b>
M.28	1	367	0.297	0.015	0.282
M.29	1	370	0.401	0.015	0.386
			<b>Valor medio</b>	=	<b>0.334</b>

# CRECIMIENTO MIXOTROFICO

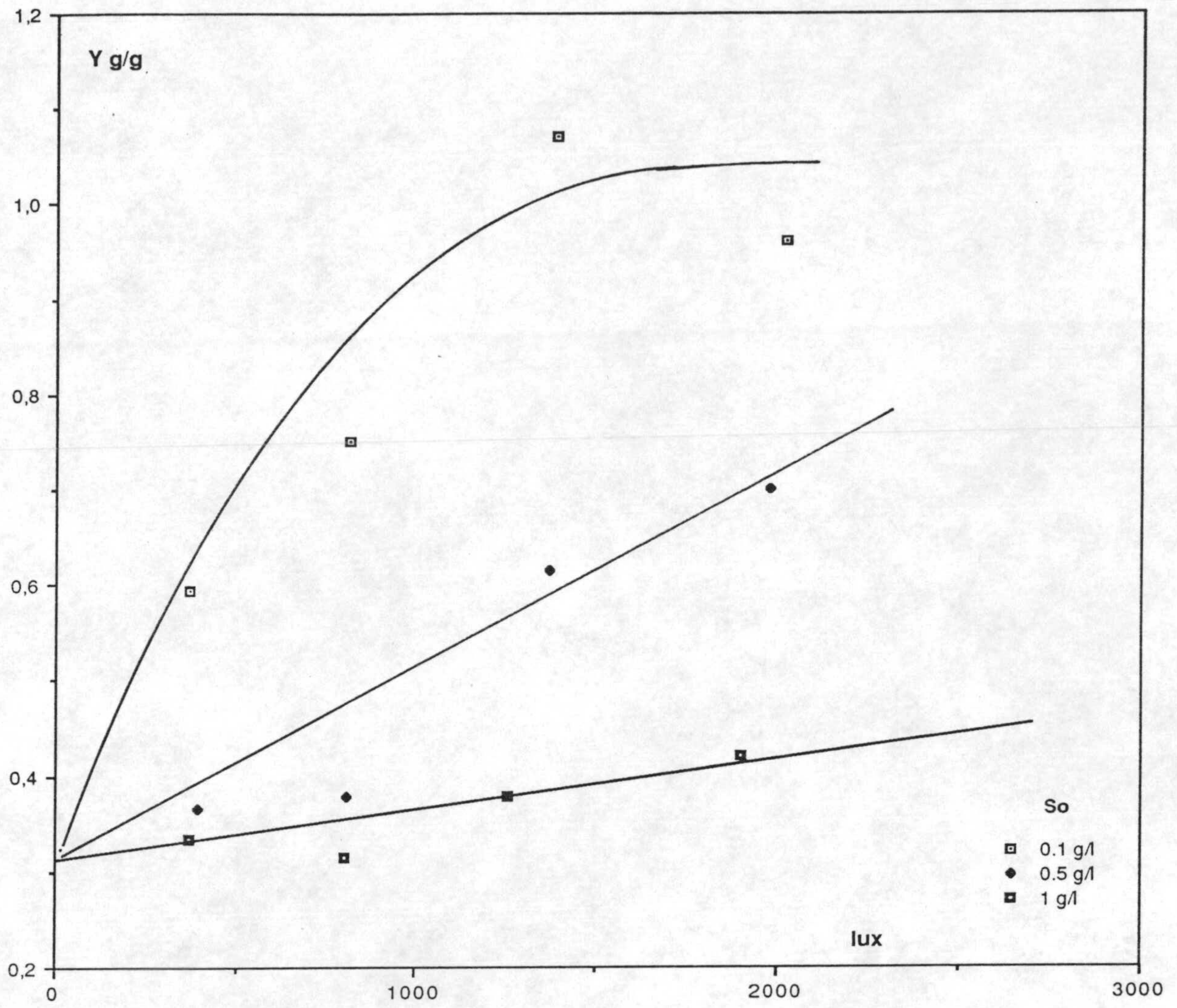


Fig 6.11



Se observa la existencia de una curva distinta para cada concentración inicial de glucosa, si bien la variación,  $Y-I_0$ , a las concentraciones de glucosa 0.5 y 1 g/L, es prácticamente lineal. Los rendimientos,  $Y$ , mayores se alcanzan a la concentración inicial de glucosa de 0.1 g/L y para cada  $S_0$  aumentan conforme la intensidad inicial de iluminación es mayor. Este aumento es menos pronunciado a la concentración de glucosa  $S_0 = 1\text{g/L}$ .

A bajas intensidades de iluminación,  $I_0$ , la influencia de la concentración de glucosa sobre el rendimiento es menos acusada, tendiendo las tres curvas hacia un valor residual único a  $I_0 = 0$  de aproximadamente  $Y = 0.3$  g biomasa seca/g glucosa.

La variación de los rendimientos medios con la intensidad inicial de iluminación se ha ajustado a una función del tipo

$$Y = \frac{\alpha + \beta I_0}{K + I_0} \quad [6.16]$$

La ecuación anterior reproduce el efecto de saturación observado a la concentración de glucosa de 0.1 g/L y también la variación lineal observada a 0.5 y 1 g/L, ya que dicha ecuación se transforma en la función lineal [6.17] cuando  $K \gg I_0$

$$Y = \frac{\alpha}{K} + \frac{\beta}{K} I_0 \quad [6.17]$$

En ambas ecuaciones  $\alpha/K$  representa el rendimiento residual al que se tiende en oscuridad y  $\beta$  el rendimiento máximo alcanzable a intensidad de iluminación muy alta.

En el ajuste, por regresión no lineal, de los valores experimentales  $Y-I_0$  a la ecuación [6.16], se han obtenido para los parámetros los valores siguientes:

Tabla 6.16

$S_0$ , g/L	$\alpha/K$ , g/g	K, lux	$\beta$ , g/g	SSQ
0.1	0.33	417	1.24	$2.31 \cdot 10^{-3}$
0.5	0.33	3733	1.24	$1.24 \cdot 10^{-2}$
1	0.33	23353	1.24	$2.60 \cdot 10^{-3}$

Este aceptable ajuste, ha permitido trazar las líneas continuas de la Figura 6.11, e indica que el valor residual del rendimiento a intensidad de iluminación  $I_0=0$  es de 0.33 y que el valor máximo del rendimiento es de 1.24 . Ambos valores  $\alpha/K$  y  $\beta$  son independientes de la concentración de glucosa. La intensidad inicial de iluminación,  $I_0$ , a la que se alcanza el valor máximo ,  $\beta$ , es tanto mayor cuanto mayor es la concentración de glucosa inicial, este hecho se pone de manifiesto en el aumento de K con  $S_0$  ya que esta constante K en la ec. [6.16] representa el valor de  $I_0$  al cual se alcanza el 63% del valor máximo de rendimiento.

Los valores de K calculados indican que al menos a las concentraciones de  $S_0 = 0.5$  y 1 g/L el rendimiento máximo es inalcanzable en la práctica.

Es interesante analizar la existencia de estos valores límites al rendimiento de un cultivo mixotrófico.

Por una parte al comparar el valor de  $\alpha/K$  obtenido con el rendimiento medio de un cultivo heterotrófico en oscuridad, determinado en un estudio anterior, que fue de 0.3 g biomasa seca (*Chlorella pyrenoidosa*)/ g glucosa, Sánchez (1986) , se observa que son prácticamente coincidentes. Este hecho, parece indicar que el límite del crecimiento mixotrófico a intensidad de iluminación cero, es el crecimiento heterotrófico. Este resultado es concordante con el obtenido por Ogawa y col. (1981), al demostrar que la velocidad específica de crecimiento mixotrófico de *Chlorella vulgaris* se reducía a la de un cultivo heterotrófico cuando se inhibía el

aparato fotosintético del alga adicionando al cultivo DCMU [3-(3,4-diclorofenil)-1.1-dimetilurea].

El valor de 0.33 es del orden de algunos rendimientos máxicos publicados para *Chlorella* en crecimiento heterotrófico. Así, Samejima y col. (1958) obtienen para *Chlorella pyrenoidosa* un rendimiento celular de 0.36-0.38 g biomasa seca producida/g glucosa consumida. Estos mismos autores con *Chlorella ellipsoidea* a 25°C, pH entre 5.6-5.8 y un medio de cultivo completo con nitratos como fuente de nitrógeno llegan a obtener un valor para Y de 0.44 g/g.

Endo y col. (1972), con *Chlorella regularis S-50*, obtienen en condiciones heterotróficas Y= 0.48 g biomasa/g sustrato, pero utilizando como fuente de nitrógeno urea. Es lógico que en estas condiciones el rendimiento máxico sea mayor, ya que al utilizar nitratos parte de la energía contenida en el sustrato se invierte en la reducción de los mismos para la síntesis de aminoácidos.

Con respecto a los valores de rendimiento máxico propios del crecimiento mixotrófico, se dispone de poca información en Bibliografía.

Endo y col. publican en (1972), valores de rendimiento mixotrófico de *Chlorella regularis S-50* en varios sustratos orgánicos, para glucosa el valor determinado es de 0.97, si bien los autores no especifican las condiciones experimentales.

Para *Chlorella vulgaris 211/8k* se han publicado un rendimiento de 0.6 g/g, Ogawa y col. (1981), obtenido en un cultivo realizado con un medio completo suplementado con glucosa a una concentración de 0.5 g/L. Las condiciones experimentales eran de T=30°C pH = 6.0, suministro de aire a 1 v/v/mín.e intensidad de iluminación de  $I_0 = 4.95$  klux.

Solo se conoce un valor alto para el rendimiento mixotrófico, de 1.24 g/g para el crecimiento de *Chlorella regularis S-50* creciendo en condiciones de luz, CO<sub>2</sub> y ácido acético, Endo y col. (1972).

Con objeto de comprobar si estos rendimientos globales medios, calculados entre el inicio del experimento y el punto que separa las zonas exponenciales de crecimiento mixotrófico y autotrófico, eran representativos de los

rendimientos existentes en el cultivo durante la zona exponencial mixotrófica, se han calculado los rendimientos instantáneos durante esta zona mediante la ecuación:

$$Y_S = \frac{C - C_0}{S_0 - S} \quad [6.17]$$

que indica que una representación de la biomasa formada a distintos tiempos de cultivo (  $C - C_0$  ) frente a la glucosa consumida (  $S_0 - S$  ), si el rendimiento  $Y_S$  es constante será una recta de ordenada en el origen cero.

En la Tabla 6.17 se indican los valores de biomasa neta formada a distintos tiempos de cultivo y los correspondientes consumos de glucosa. Estos valores se han representado en las Figuras 6.12, 6.13 y 6.14 para tres niveles de intensidad de iluminación inicial. Se observa que a una misma intensidad de iluminación, los valores correspondientes a distintas concentraciones de glucosa parecen ajustarse a una única recta.

En la Tabla 6.18 se indican las pendientes de estas rectas calculadas mediante regresión lineal. Los rendimientos instantáneos,  $Y_S$ , durante la zona exponencial mixotrófica parecen ser independientes de la concentración inicial de glucosa y aumentan al incrementarse la intensidad inicial de iluminación lo que indica un mayor aprovechamiento de la luz al aumentar su intensidad.

Los rendimientos instantáneos están comprendidos entre los dos valores límites de rendimiento global 0.33 que corresponde al crecimiento heterotrófico y 1.24 que corresponde al mixotrófico a altas intensidades de iluminación, y se aproximan al valor superior al aumentar la intensidad de iluminación.

Es interesante comparar estos rendimientos instantáneos con las velocidades específicas de consumo de glucosa determinadas en el apartado anterior. De acuerdo con la expresión generalmente utilizada para la velocidad específica de consumo de nutriente que puede ser fuente de carbono y energía

$$q_S = \frac{1}{Y_S} \mu + m \quad [6.19]$$

TABLA 6.17

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

So = 0.1 g/l		Io ≈ 2000 lux				
EXPTO.	t,h	C, g/l	Co, g/l	(C-Co), g/l	(So-S),mg/l	
M.3	1.25	0.013	0.010	0.003	10.1	
M.2	1.50	0.015	0.012	0.003	11.1	
M.3	12.50	0.039	0.010	0.029	29.1	
M.2	13.00	0.053	0.012	0.041	32.1	
So = 0.5 g/l		Io ≈ 2000 lux				
TM.5	21.75	0.140	0.013	0.137	98.1	
M.7	22.00	0.099	0.015	0.084	83.1	
M.7	24.50	0.131	0.015	0.116	90.1	
So = 1 g/l		Io ≈ 2000 lux				
M.10	1.25	0.015	0.011	0.004	39.0	
M.10	12.50	0.044	0.011	0.033	49.0	
M.11	22.00	0.109	0.015	0.094	130.1	
M.11	22.00	0.146	0.015	0.094	135.1	
So = 0.1 g/l		Io ≈ 1400 lux				
M.12	20.00	0.071	0.012	0.059	34.1	
M.12	22.50	0.087	0.012	0.075	45.1	
So = 0.5 g/l		Io ≈ 1400 lux				
M.15	22.50	0.182	0.015	0.167	233.1	
So = 1 g/l		Io ≈ 1400 lux				
M.17	14.00	0.069	0.015	0.054	42.79	
M.17	22.50	0.186	0.015	0.171	243.1	

TABLA 6.17 (Continuación)  
 CRECIMIENTO MIXOTROFICO

So = 0.1 g/l		Io ≈ 400 lux				
M.25	10.00	0.038	0.014	0.024	33.1	
M.25	21.25	0.073	0.014	0.059	59.1	
So = 0.5 g/l		Io ≈ 400 lux				
M.26	9.5	0.044	0.015	0.029	33.0	
M.27	21.25	0.112	0.014	0.098	154.1	
M.27	26.00	0.237	0.014	0.223	422.6	
So = 1 g/l		Io ≈ 400 lux				
M.28	9.5	0.052	0.015	0.037	70.1	
M.29	10.00	0.046	0.015	0.031	47.1	
M.29	21.25	0.133	0.015	0.118	205.1	
M.29	26.00	0.314	0.015	0.299	525.1	
M.29	28.25	0.467	0.015	0.452	913.1	

# CRECIMIENTO MIXOTROFICO

$I_0 = 2000 \text{ lux}$

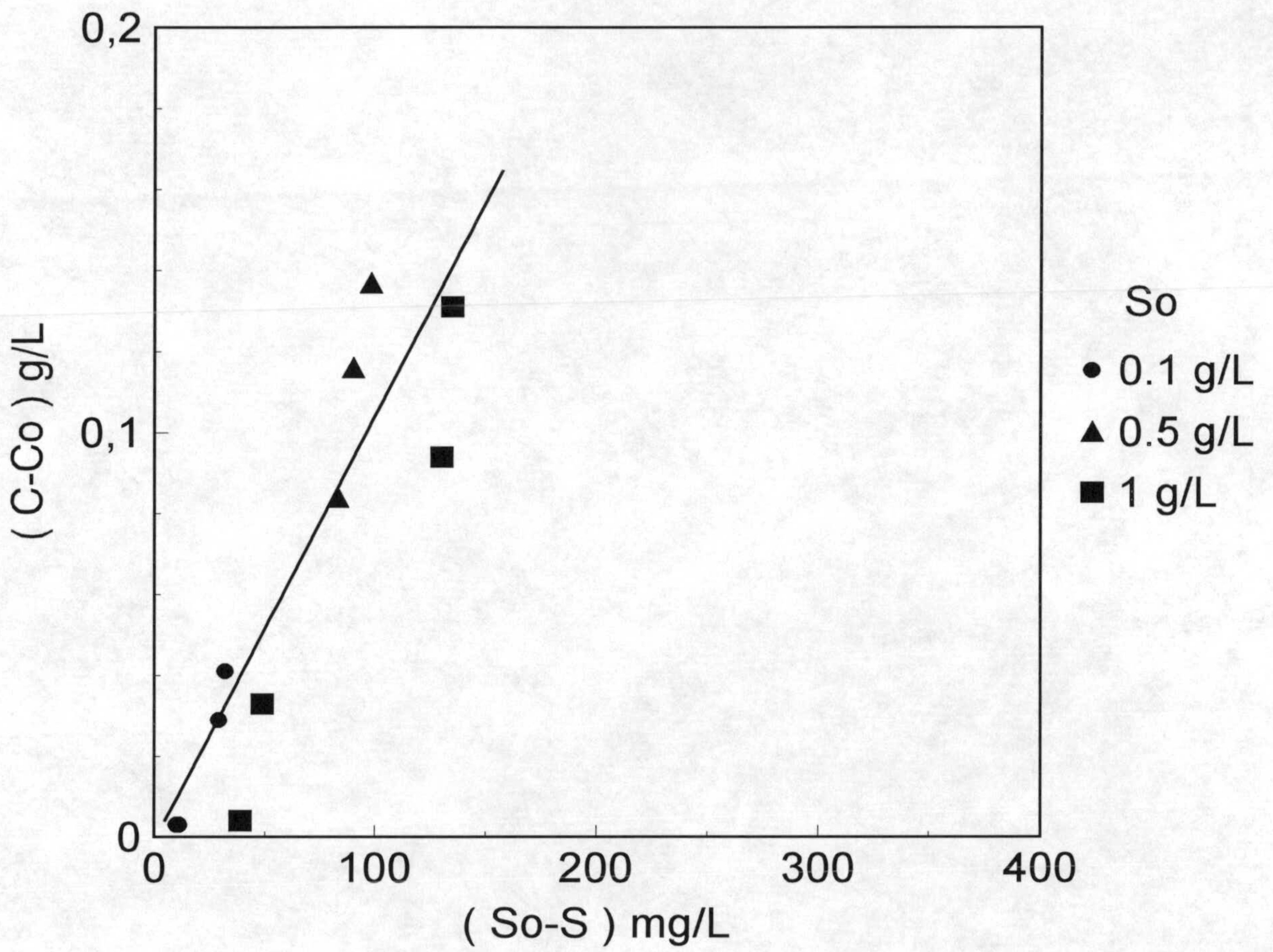


Fig. 6.12

# CRECIMIENTO MIXOTROFICO

$I_0 = 1400 \text{ lux}$

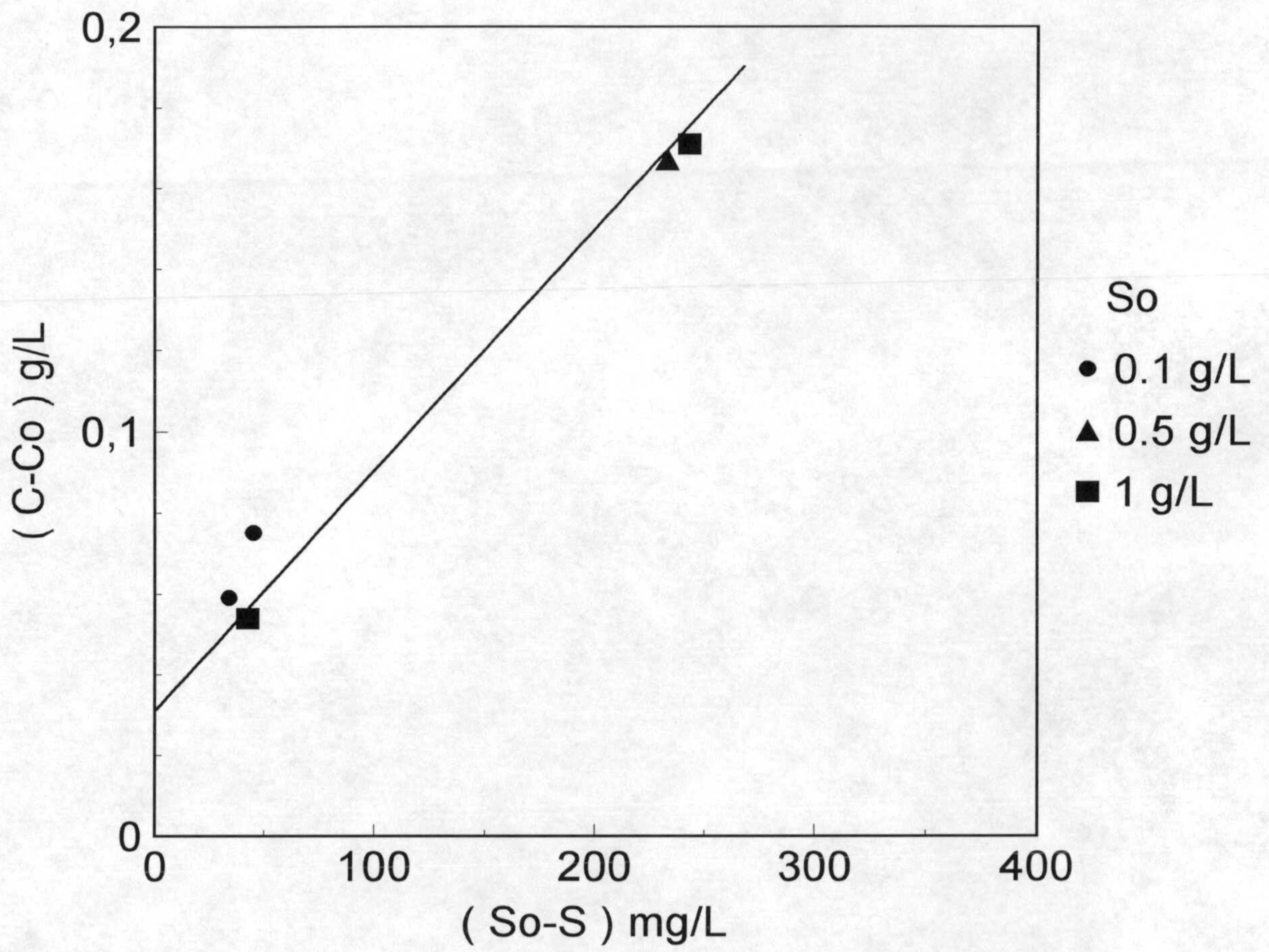


Fig. 6.13



# CRECIMIENTO MIXOTROFICO

$I_0 = 400 \text{ lux}$

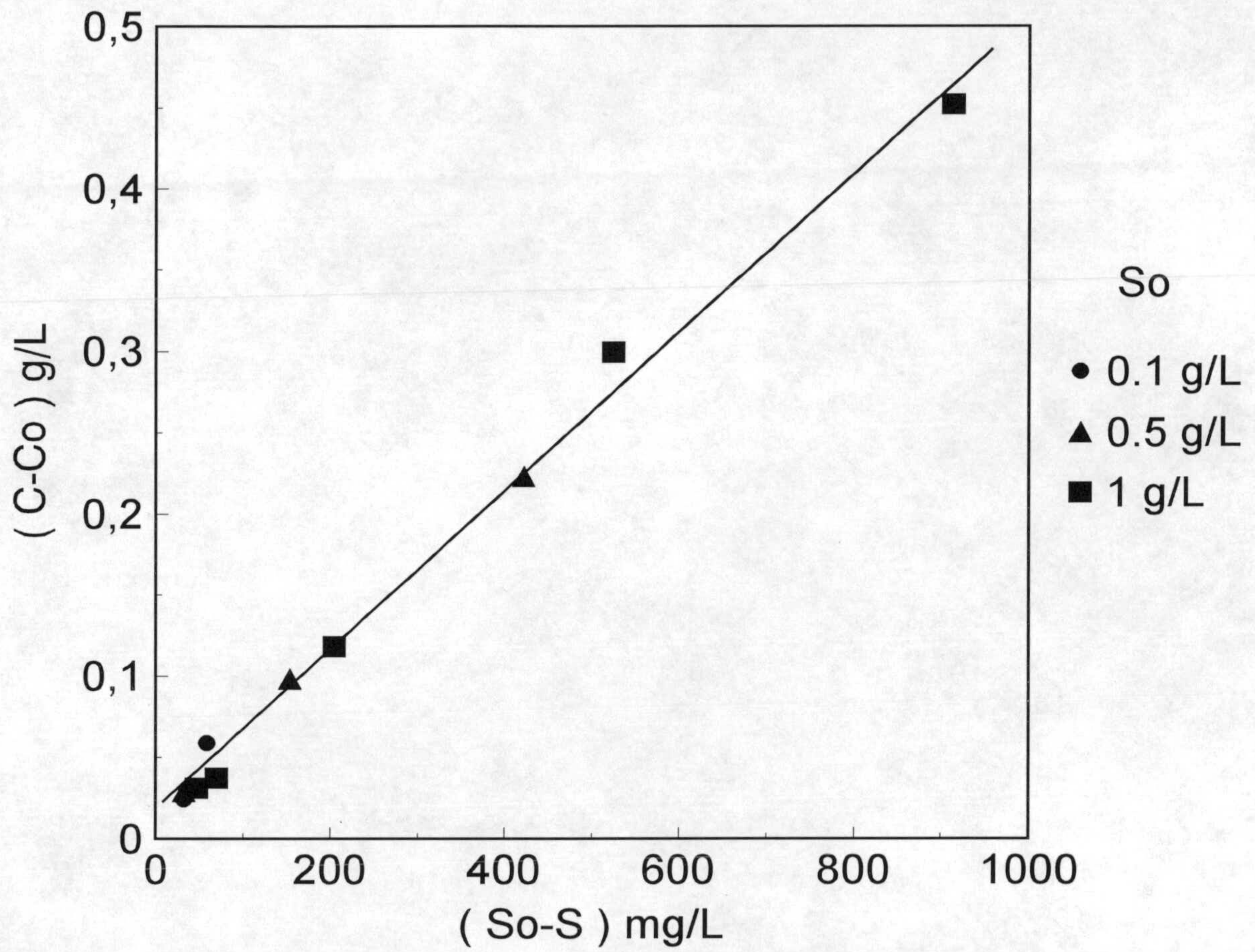


Fig. 6.14

TABLA 6.18

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

RENDIMIENTOS EN BIOMASA

<u>Io, lux</u>	<u>Y<sub>S</sub>, g/g</u>	<u>r<sup>2</sup></u>
2000	1.03	0.914
1400	0.61	0.971
400	0.50	0.9962

y el valor previamente determinado para la velocidad específica de crecimiento en la zona exponencial de  $0.103 \text{ h}^{-1}$ , debería cumplirse en esta zona que:

$$q_s = \frac{1}{Y_S} 0.103 + m \quad [6.20]$$

Si en el cultivo mixotrófico el mantenimiento fuera satisfecho por la luz absorbida,  $q_s$  debería ser igual a  $0.103/Y_S$ , si no es así, si la luz no soporta totalmente el mantenimiento  $q_s$  debería ser mayor, pero si la luz se invierte en el mantenimiento y también en la fotosíntesis parte de la biomasa celular procedería de la fijación de  $\text{CO}_2$  gaseoso y  $q_s$  podría ser menor que  $0.103/Y_S$ .

En la Tabla 6.19 se indican las desigualdades obtenidas:

TABLA 6.19  
CRECIMIENTO MIXOTROFICO

$$q_s = \frac{1}{Y_s} \mu + m$$

$I_o$ , lux	$q_s$ , g/g h	$(1/Y_S) \mu$ , g/g h	
2000	0.055	0.100	$q_s < (1/Y_S) \mu$
1400	0.146	0.169	$q_s < (1/Y_S) \mu$
400	0.181	0.206	$q_s < (1/Y_S) \mu$

A las tres intensidades de iluminación los resultados sugieren que la luz se usa no solo en la forma de energía para el mantenimiento sino también en la fijación de CO<sub>2</sub> gaseoso. Esta fijación de CO<sub>2</sub> es clara a la mayor intensidad de iluminación y tiende a no efectuarse conforme disminuye la intensidad de iluminación, constituyendo la glucosa un 55% de la biomasa formada a 2000 lux y un 86% y 88% a las intensidades de 1400 y 400 lux.

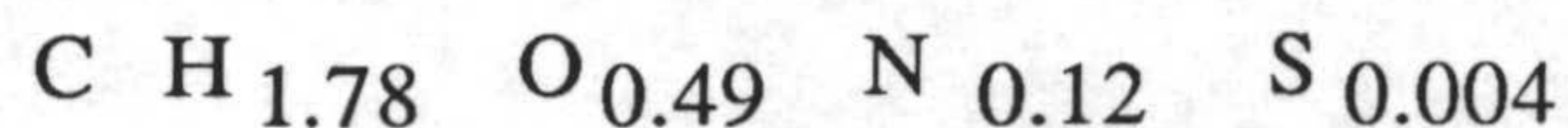
En todos los casos conforme los cultivos se hacen densos parece haber una preferencia en utilizar la glucosa tanto para la biosíntesis como para el mantenimiento, lo que determina que los rendimientos globales al finalizar la zona exponencial sean inferiores a los instantáneos

#### 6.1.4.2 Estudio estequiométrico.

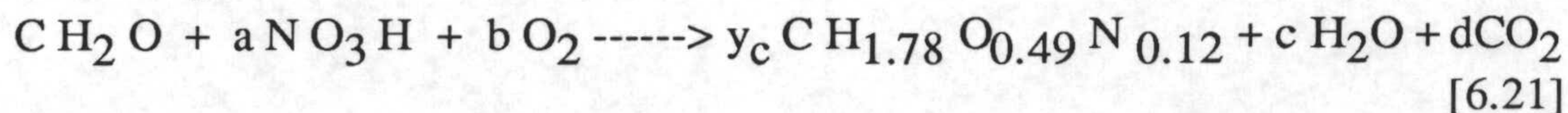
Como paso previo al estudio estequiométrico se efectuó el análisis elemental de la biomasa, lo que permitió establecer las siguientes composiciones:

C - 51.23%	H - 7.61%	O - 33.57%
N - 7.03 %	S - 0.56%	

que determinan una fórmula elemental:



No considerando el S por ser minoritario en la biomasa, la ecuación estequiométrica representativa del crecimiento, desde un punto de vista macroscópico es:



La formulación de los balances de C,H,O,N y el uso de la definición del rendimiento másico:

$$Y_s = \frac{y_c \cdot PM_b}{1 \cdot PM_s} \quad [6.22]$$

donde PM son los pesos moleculares de la biomasa  $PM_b = 23.3$  y sustrato orgánico  $PM_s = 30$ , permiten obtener las siguientes expresiones para el cálculo de los coeficientes estequiométricos:

$$y_c = 1,29 Y_s \quad [6.23]$$

$$d = 1 - y_c \quad [6.24]$$

$$a = 0.12 y_c \quad [6.25]$$

$$c = \frac{2+a- 1.78 y_c}{2} \quad [6.26]$$

$$b = \frac{0.49 y_c + c + 2d -1 -3a}{2} \quad [6.27]$$

En la Tabla 6.20 se indican los valores de estos coeficientes para los experimentos considerados en el análisis de rendimientos instantáneos

TABLA 6.20

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

$I_0, \text{lux}$	$Y_S \text{ g/g}$	$y_c$	$d$	$a$	$c$	$b$
2000	1.03	1.3287	-0.3287	0.1594	-0.1028	-0.7937
1400	0.61	0.7869	0.2131	0.0944	0.3469	-0.0622
400	0.50	0.6450	0.3550	0.0774	0.4647	0.1293

Solo los experimentos realizados a la intensidad de iluminación de 2000 lux determinan un coeficiente para  $d$  negativo, lo que implica fijación del dióxido de carbono aportado a los cultivos. Esta situación se confirma por el elevado valor de  $y_c$ , rendimiento en carbono, superior a la unidad.

Por otra parte el análisis del signo para el coeficiente estequiométrico del oxígeno parece indicar que la fotosíntesis y generación de oxígeno, solo se efectúa a las intensidades de 2000 y 1400 lux, frente a algo de consumo de oxígeno que ya se produce a la intensidad de iluminación más pequeña

Estos resultados aunque de forma global confirman el estudio realizado en

el análisis de los rendimientos instantáneos. Es decir a altas intensidades de iluminación la luz soporta el mantenimiento celular y se invierte en la fijación fotosintética, a intensidades intermedias es capaz solo de soportar el mantenimiento celular y a intensidades pequeñas no es capaz ni siquiera de soportar este mantenimiento celular teniendo también necesidad de la combustión de la glucosa para tal fin.

Evidentemente, en un cultivo discontinuo se puede pasar por más de una de las tres situaciones mencionadas ya que conforme aumenta la densidad celular disminuye la luz disponible por célula.

Esto justifica por una parte que los rendimientos globales sean inferiores a los instantáneos y que exista diferencia en los rendimientos globales con la concentración de glucosa ya que la densidad celular que se alcanza en los cultivos es mayor cuanto mayor es la concentración de la misma

#### 6.1.4.3 Rendimiento bionergético

Es frecuente en Bibliografía la comparación de diferentes tipos de crecimiento en base al rendimiento bionergético global H.Y. Lee y cols.(1985)

Para el cálculo de este rendimiento se ha utilizado la ecuación [2.36] deducida en la Introducción de esta Memoria.

$$\eta_E = \frac{Q_b \gamma_b Y_c}{Q_s \gamma_s + Q_r} \quad [2.36]$$

Para un compuesto de fórmula  $CH_mO_lN_p$ , el grado de reducción se puede calcular mediante la expresión:

$$\gamma = 4 + m - 2l + 5p \quad [6.28]$$

Así el grado generalizado de reducción para la glucosa,  $C_6 H_{12} O_6$   $CH_6O$  es  $\gamma_s = 4$  equiv  $e^-$  y para la biomasa  $\gamma_b = 5.39$ . El coeficiente de  $p$  en la expresión [6.28] es +5 siempre y cuando se utilicen nitratos como fuente de nitrógeno. Heijnen y col. (1981) deducen, que en general, la biomasa de cualquier microorganismo tiene un valor de  $\gamma_b = 5.45$  próximo al determinado para *Chlorella* a partir del análisis elemental.

Dado que para cada experimento la intensidad inicial de iluminación,  $I_0$ , permanece constante en el tiempo, la energía luminosa total recibida por el cultivo desde el comienzo del mismo hasta el momento en que se determina el rendimiento, puede evaluarse como:

$$E = I_0 \cdot t \quad , \text{ lux h} \quad [6.29]$$

siendo  $t$  el tiempo al cual se mide  $C_m$ .

Considerando las regularidades energéticas para sustrato y biomasa de 113 KJ/mol C, que 1 lux de luz con la distribución espectral utilizada es equivalente a  $1.20 \cdot 10^{-6}$  KJ/cm<sup>2</sup> h y que el área iluminada es la correspondiente a la sección transversal del recipiente de cultivo.

$$A = 7.5 \text{ cm} \cdot 11.3 \text{ cm} = 84.75 \text{ cm}^2$$

la ecuación [2.36] se transforma en:

$$\eta_E = \frac{609.07 \cdot y_c}{452 + \frac{E}{S_0} \cdot 0.006102} \quad [6.30]$$



donde cada uno de los términos del segundo miembro de esta ecuación va expresado en  $\text{KJ/mol C}$ .

En la Tabla 6.21 se indican estos rendimientos bioenergéticos medios así como la información precisa para su cálculo. En la Figura 6.15 se han representado estos rendimientos frente a la intensidad inicial de iluminación y la concentración inicial de glucosa.

Los valores de rendimiento correspondientes a 0.5 y 1 g/L de glucosa pueden ajustarse a una única línea diferente de la trazada para 0.1 g/L. Los rendimientos bioenergéticos disminuyen al aumentar la intensidad de iluminación, muy ligeramente a las concentraciones de glucosa mayores, lo que indica una menor aportación del proceso fotosintético al crecimiento global en estas condiciones. De forma más acusada a la concentración de 0.1 g/L.

Este hecho se confirma en la representación frente a la concentración de glucosa inicial. A la menor intensidad de iluminación los rendimientos han alcanzado su mayor valor del orden de 0.49 y son independientes de la concentración de glucosa inicial. Este rendimiento es del orden del obtenido para esta misma alga en crecimiento heterotrófico de valor 0.509.

Los menores valores de  $\eta_E$  a 0.1 g/L indican un mayor componente fotosintético en estas condiciones ya que en general los menores rendimientos bioenergéticos se alcanzan en crecimiento puramente autotrófico. Los rendimientos bioenergéticos para crecimiento mixotrófico están comprendidos entre los correspondientes a los crecimientos heterotrófico y autotrófico.

TABLA 6.21

CRECIMIENTO MIXOTROFICO

RENDIMIENTO BIOENERGETICO

$S_{O_2}$ ,g/L	$I_0$ ,lux	E, lux.h	Y	$y_c$	$\eta_E$
0.1	2000	46797	0.960	1.2384	0.2280
0.1	1386	33091	1.070	1.3803	0.3401
0.1	814	22894	0.750	0.9675	0.3187
0.1	372	8315	0.595	0.7676	0.4873
0.5	1981	86917	0.700	0.9030	0.3635
0.5	1370	48635	0.615	0.7934	0.4622
0.5	809	24068	0.379	0.4889	0.3993
0.5	395	11403	0.366	0.4721	0.4864
1	1903	80640	0.420	0.5418	0.3495
1	1255	45180	0.378	0.4876	0.4081
1	802	25464	0.315	0.4064	0.4075
1	369	11612	0.334	0.4309	0.5020

# CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO

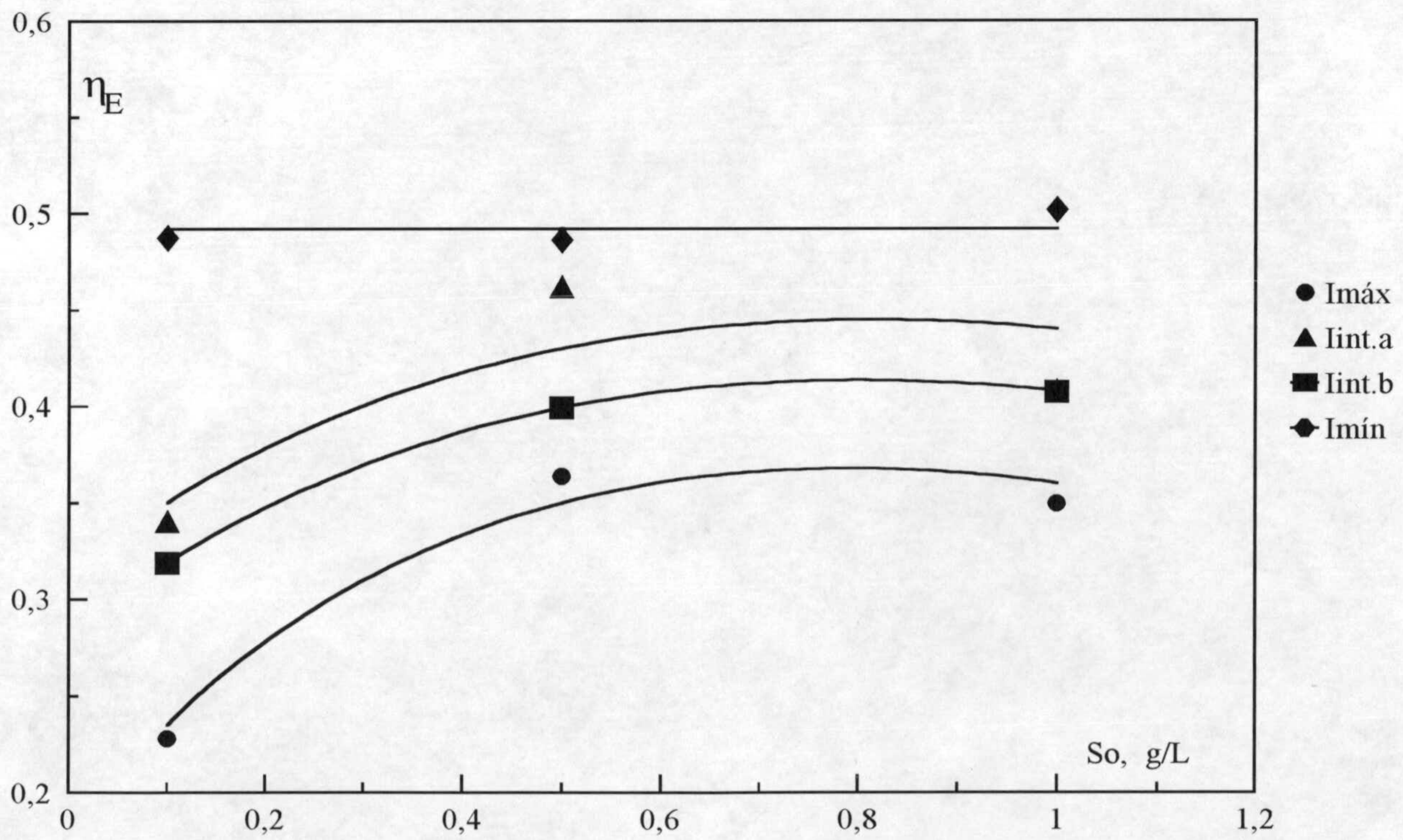
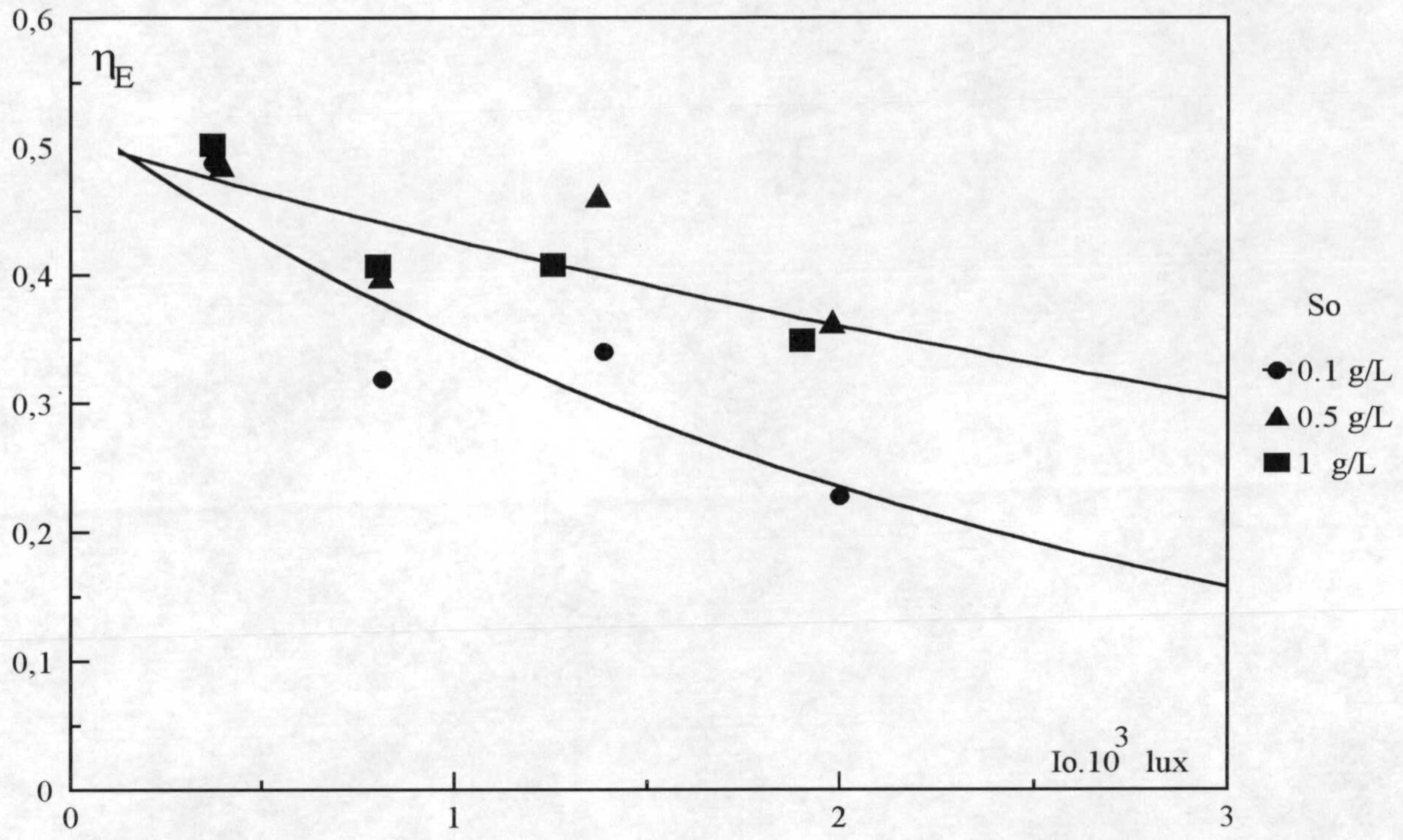
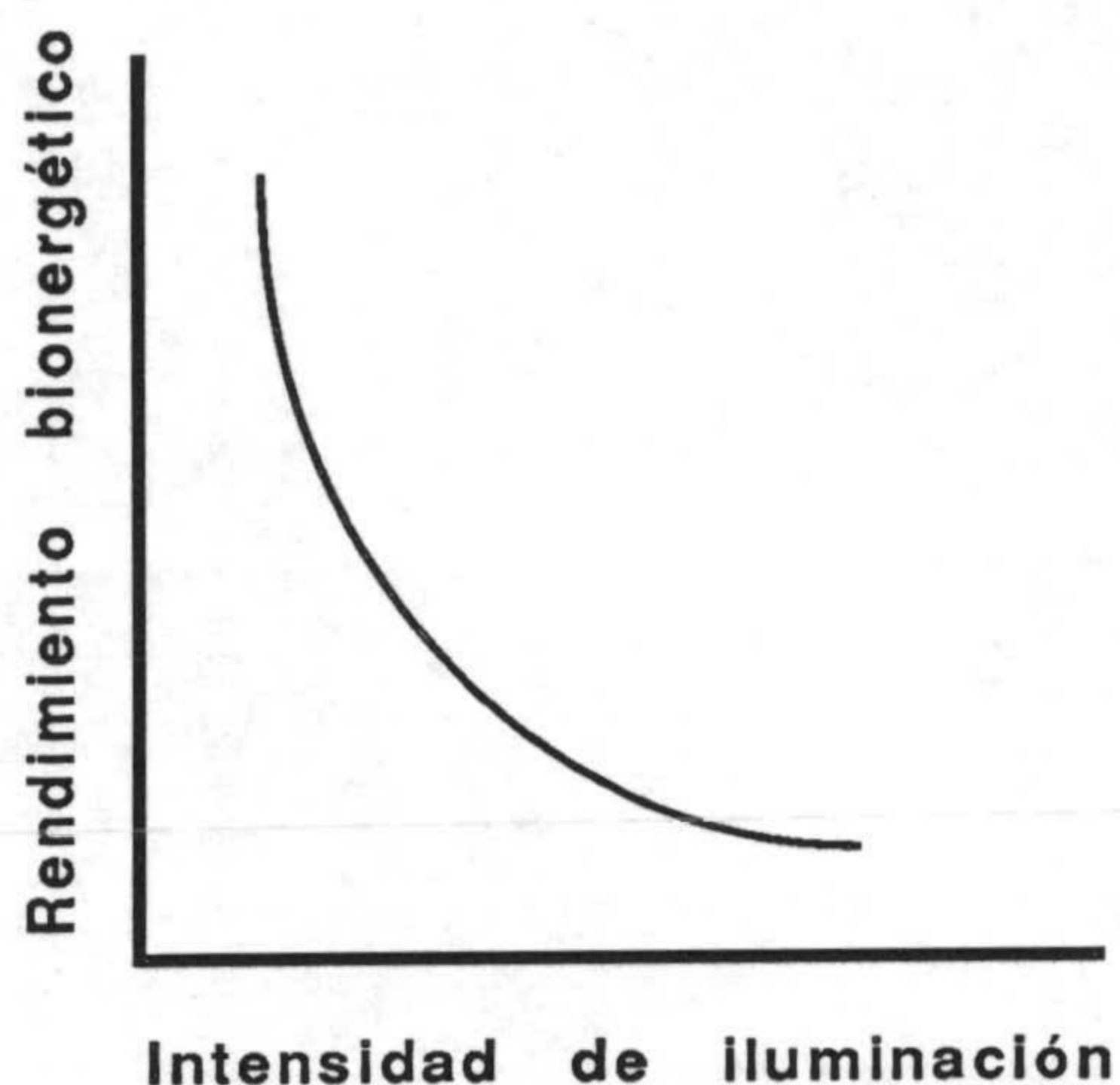


FIG. 6.15

Para *Chlorella pyrenoidosa* en crecimiento autotrófico se dispone de los resultados experimentales de Myers (1980) tratados por Lee y cols. (1984). Estos últimos autores determinan los rendimientos bioenergéticos encontrando que varían en el intervalo de 0.1621 - 0.1277 la disminución se produce al aumentar la intensidad de iluminación. Para *Spirulina*, la gráfica siguiente ilustra la variación del rendimiento bioenergético autotrófico con la intensidad de iluminación, Lee y cols. (1987)



La disminución del rendimiento bioenergético al aumentar la intensidad inicial de iluminación ha sido observada por muchos autores que encuentran los mayores valores de  $\eta_E$  a intensidades por debajo de la correspondiente a la saturación. Se han barajado diferentes hipótesis para explicar este hecho, la más extendida considera que la luz absorbida por las algas es utilizada más eficientemente cuando la densidad de receptores útiles, moléculas de clorofila, es mas grande. En la absorción de la luz intervienen receptores útiles fotosintéticamente y otras moléculas biológicas que no tienen utilidad fotosintética, éstas últimas se producen más a altas intensidades de iluminación con el objetivo de proteger al alga de un posible daño fotoquímico.

## 6.2. CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

Los valores de las velocidades específicas de crecimiento fotoheterotrófico se presentan en las Tablas 6.22 a 6.24 correspondientes a los experimentos F.1 a F.24 y PHF.4, realizados a las concentraciones de glucosa 0.1, 0.5 y 1 g/L y a tres niveles de intensidad inicial de iluminación 2000, 1400 y 400 lux. Cada una de las tablas corresponde a una intensidad inicial de iluminación,  $I_0$ , distinta, los valores de  $\mu$  van agrupados según la concentración inicial de glucosa,  $S_0$ .

### 6.2.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA

En la Figura 6.16 se han representado en coordenadas lineales los valores de la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  frente a la concentración inicial de glucosa,  $S_0$ , para los experimentos correspondientes al nivel de iluminación inicial máximo.

Al igual que en el crecimiento mixotrófico en el margen de concentraciones de glucosa utilizado 0.1 a 1 g/L puede considerarse que la velocidad específica es independiente de la misma creciendo el alga a su velocidad máxima  $\mu_m$ .

A este nivel máximo de intensidad de iluminación el valor medio de  $\mu_m$  es de  $0.108 \text{ h}^{-1}$  valor similar al obtenido en crecimiento mixotrófico.

Tampoco hay influencia de la concentración inicial de sustrato a los demás niveles de intensidad inicial de iluminación utilizados. En la Tabla 6.25 se indican los valores medios de la velocidad específica máxima  $\mu_m$  a los tres niveles de intensidad inicial.

TABLA 6.22

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO  
VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

EXPTO	Io, lux	So,g/L	$\mu, h^{-1}$	$r^2$
F.1	1963	0.1	0.0962	0.984
F.2	1963	0.1	0.1048	0.972
F.3	1963	0.1	0.0868	0.997
F.4	1963	0.1	0.1120	0.970
F.5	1955	0.1	0.0994	0.991
F.6	1955	0.1	0.0974	0.999
F.7	1938	0.1	0.0972	0.979
F.8	1938	0.1	0.1169	0.983
F.9	1955	0.5	0.1340	0.997
PHF.4	1955	0.5	0.1163	0.985
F.10	1938	1	0.1243	0.994
F.11	1938	1	0.1118	0.982

TABLA 6.23

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO  
 VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

EXPTO	Io, lux	So,g/L	$\mu, h^{-1}$	$r^2$
F.12	1461	0.1	0.1354	0.998
F.13	1427	0.5	0.1084	0.995
F.14	1351	1	0.1359	0.996

TABLA 6.24

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO  
 VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

EXPTO	$I_0$ , lux	$S_0$ , g/L	$\mu$ , $h^{-1}$	$r^2$
F.15	429	0.1	0.1110	0.981
F.16	429	0.1	0.0852	0.998
F.17	429	0.1	0.1217	0.989
F.18	436	0.1	0.1018	0.960
F.19	429	0.1	0.1116	0.982
F.20	400	0.1	0.1075	0.995
F.21	436	0.5	0.1126	0.979
F.22	400	1	0.1000	0.940
F.23	400	1	0.0985	0.979
F.24	436	1	0.0963	0.973



# FOTOHETEROTRÓFICO

$I_0 = 2000 \text{ LUX}$

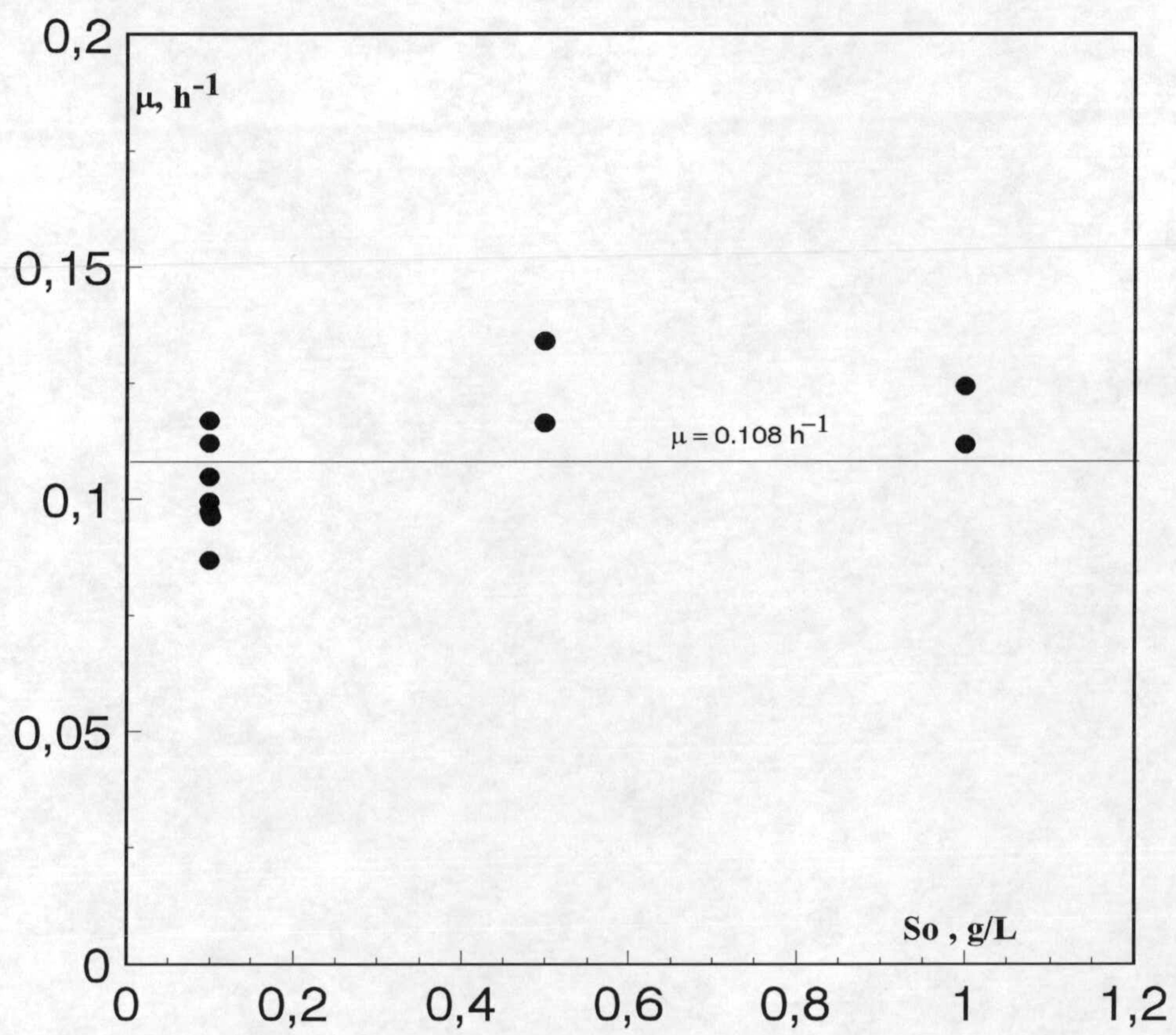


FIG. 6.16

TABLA 6.25

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO  
VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

$I_0$ , lux	$\mu_m$ , h <sup>-1</sup>
2000	0.108
1300	0.127
400	0.105

Para comprobar la no influencia de la concentración de glucosa sobre el crecimiento se ha realizado un análisis de la varianza, de una vía, utilizando el paquete de software matemático IMSL, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo	Números de Experimentos	$\mu$ media
0.1 g/L	15	0.1057
0.5 g/L	4	0.1178
1 g/L	6	0.1111

Media global de todos los experimentos  $\mu_m = 0.109 \text{ h}^{-1}$

Valor de la F = 1,355998 Grados de libertad (2,22)

Probabilidad de la cola  $\alpha = 0.2784$

El valor de  $\alpha$  obtenido es claramente superior a 0.05 con lo que se puede afirmar que no hay influencia de la concentración de glucosa.

## 6.2.2 INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE ILUMINACION

Los valores de la velocidad específica máxima  $\mu_m$  en la Tabla 6.25 no parecen variar según una tendencia definida con respecto a  $I_0$ . Mas claramente se observa esto en la Figura 6.17 donde se han representado todos los valores de  $\mu$  indicados en las Tablas 6.22 a 6.24 en función de la intensidad inicial de iluminación,  $I_0$ .

Al igual que en crecimiento mixotrófico parece que la intensidad de saturación  $I_S$ , para el crecimiento fotoheterotrófico es inferior a 400 lux.

Los datos de intensidad de saturación de que se dispone en Bibliografía son muy escasos y no corresponden exactamente al crecimiento fotoheterotrófico en el que no se suministra  $CO_2$ .

La no influencia de la intensidad inicial de iluminación, sobre la velocidad específica de crecimiento, se ha confirmado mediante el análisis de varianza de una sola via utilizando IMSL, los resultados obtenidos son los siguientes:

Grupo	Número de experimentos	$\mu$ media
2000 lux	12	0.1081
1300 lux	3	0.1266
400 lux	10	0.1046
GLOBAL	25	0.1089

Valor de la F= 3.559963 Grados de libertad (2,22)

Probabilidad de la cola  $\alpha = 0.050$

La gran similitud entre los valores medios de  $\mu_m$  obtenidos en crecimiento mixotrófico y fotoheterotrófico indica que la posibilidad de fijación fotosintética del  $CO_2$ , que existía en crecimiento mixotrófico, no influye en la cinética de crecimiento

# FOTOHETEROTRÓFICO

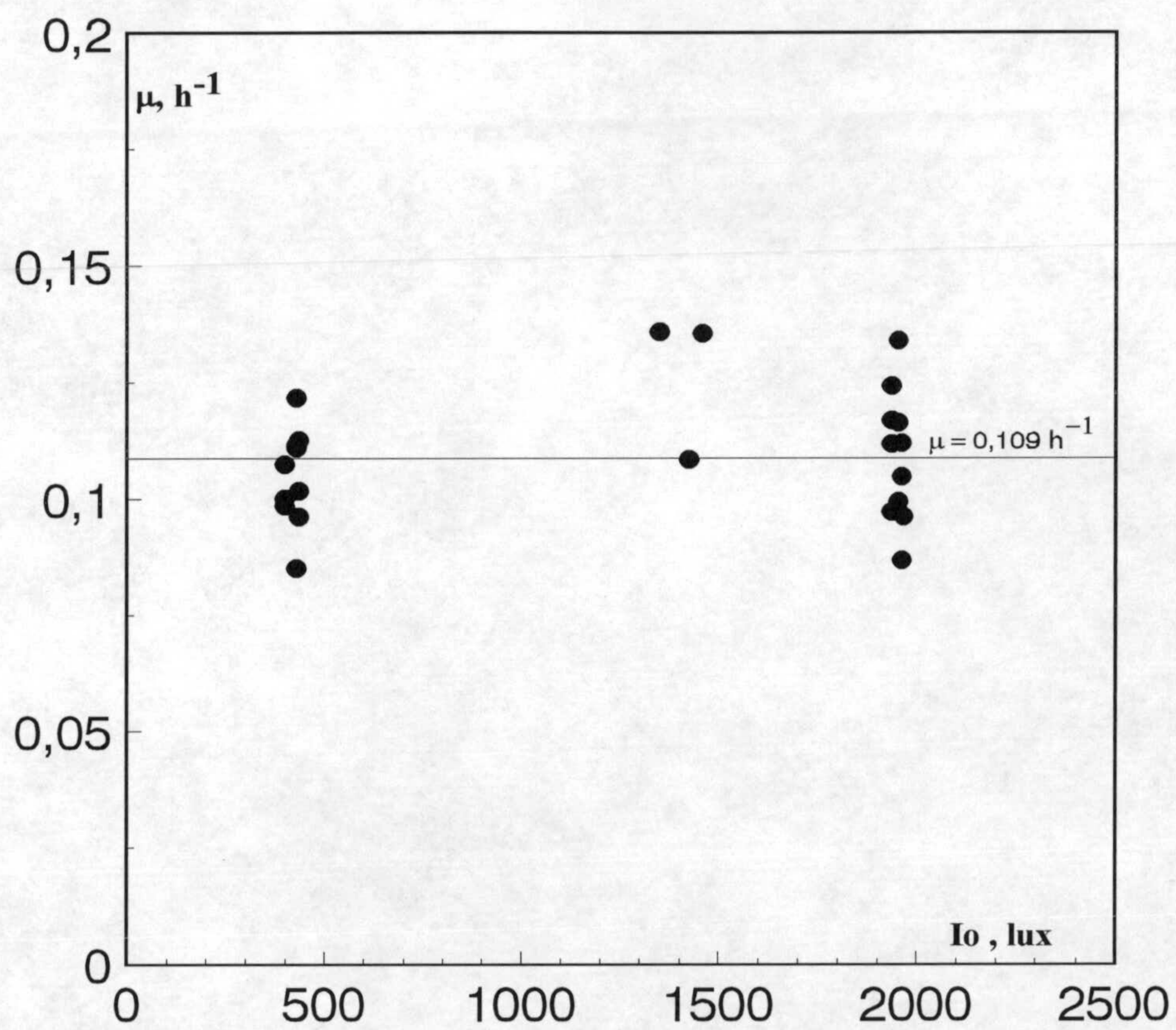


FIG. 6.17

### 6.2.3 CONTENIDO EN CLOROFILA

En las Tablas 6.26 se indican las concentraciones de clorofila total, expresadas en mol/L, las concentraciones de biomasa en g/L en un tiempo igual o próximo al indicado para la clorofila y el % en peso de clorofila en la biomasa.

La concentración de clorofila total aumenta en el tiempo durante la fase de crecimiento exponencial, alcanzándose en muchos de los experimentos un valor aproximadamente constante al entrar el cultivo en la fase estacionaria.

A un mismo nivel de la intensidad de iluminación incidente el valor final de la concentración de clorofila aumenta al aumentar la concentración de glucosa, debido a una mayor densidad celular final. Sin embargo, los contenidos en clorofila por unidad de peso seco de células no varían significativamente ni al transcurrir el tiempo en cada uno de los experimentos realizados ni al comparar experimentos realizados en distintas condiciones ambientales. En la Figura 6.18 se observa la relación lineal existente entre la concentración de clorofila y la de biomasa para los experimentos realizados a nivel máximo y mínimo de intensidad de iluminación.

Este resultado es consistente con lo anterior y con lo encontrado en la Bibliografía con respecto a las dos situaciones extremas es decir el alga adapta su contenido en clorofila en función de su utilización de la energía luminosa. En condiciones autotróficas el % CHL de la biomasa, aumenta en el transcurso del tiempo, en condiciones heterotróficas( en oscuridad) el % CHL de la biomasa decrece en el tiempo, Karlander y col. (1966), siendo por tanto las condiciones existentes en el crecimiento fotoheterotrófico intermedias.

La representación en coordenadas semilogarítmicas, Figura 6.19, de las concentraciones de clorofila, P, durante las fases de crecimiento exponencial en los

TABLA 6.26

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO F.1  $S_0 = 0.1 \text{ g/L}$   $I_0 = 1963 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
0	0.248	0.012	1.861
6	0.673	0.024	2.525
30	2.627	0.131	1.806
47	2.500	0.104	2.165

EXPTO F.2  $S_0 = 0.1 \text{ g/L}$   $I_0 = 1963 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
3	0.197	0.017	1.044
20	0.838	0.087	0.867
22	1.318	0.109	1.088
27	2.006	0.140	1.290
46	3.403	0.171	1.792

TABLA 6.26 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO F.9  $S_0 = 0.5 \text{ g/L}$   $I_0 = 1955 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
0	0.248	0.014	1.595
6	0.543	0.026	1.880
23	2.280	0.261	0.786
30	3.815	0.283	1.214
47	3.745	0.300	1.124

TABLA 6.26 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO F.10  $S_0 = 1 \text{ g/L}$   $I_0 = 1938 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
0	0.248	0.012	1.861
6	0.529	0.023	2.071
30	5.511	0.501	0.990
47	5.465	0.500	0.984

EXPTO F.11  $S_0 = 1 \text{ g/L}$   $I_0 = 1938 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
3	0.416	0.020	1.873
20	1.098	0.101	0.979
22	1.439	0.125	1.037
27	2.929	0.254	1.038
46	11.120	0.520	1.726



TABLA 6.26 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO F.12  $S_0 = 0.1 \text{ g/L}$   $I_0 = 1461 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
0	0.370	0.012	2.776
4.75	0.607	0.027	2.024
22.75	1.595	0.076	1.890
29.75	2.439	0.088	2.496

EXPTO F.13  $S_0 = 0.5 \text{ g/L}$   $I_0 = 1427 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
0	0.370	0.015	2.221
4.75	0.463	0.032	1.363
22.75	2.073	0.197	0.948
29.75	4.097	0.213	1.732

EXPTO F.14  $S_0 = 1 \text{ g/L}$   $I_0 = 1351 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
0	0.370	0.015	2.221
4.75	0.501	0.028	1.611
22.75	3.029	0.358	0.762
29.75	4.559	0.359	1.144

TABLA 6.26 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO F.15  $S_0 = 0.1 \text{ g/L}$   $I_0 = 429 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
0	0.269	0.016	1.514
5.25	0.656	0.028	2.110
23	1.768	0.069	2.307
29	1.628	0.066	2.221

EXPTO F.16  $S_0 = 0.1 \text{ g/L}$   $I_0 = 429 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
13.5	0.892	0.035	2.295
22	1.275	0.054	2.126
40.5	2.012	0.100	1.812

EXPTO F.21  $S_0 = 0.5 \text{ g/L}$   $I_0 = 436 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
0	0.269	0.017	1.425
5.25	0.677	0.027	2.258
23	2.001	0.200	0.901
29	1.938	0.183	0.954

TABLA 6.26 (Continuación)

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO F.22  $S_0 = 1 \text{ g/L}$   $I_0 = 400 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
0	0.269	0.013	1.863
23	1.923	0.346	0.548
29	2.445	0.327	0.673

EXPTO F.23  $S_0 = 1 \text{ g/L}$   $I_0 = 400 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
13.5	1.046	0.036	2.616
15	0.891	0.046	1.744
22	1.346	0.063	1.924
40.5	3.241	0.468	0.624

EXPTO F.24  $S_0 = 1 \text{ g/L}$   $I_0 = 436 \text{ lux}$

t,h	$P \cdot 10^6 \text{ mol/L}$	C, g/L	% CHL
13.5	0.788	0.035	2.027
15	0.939	0.043	1.966
22	1.450	0.064	2.040
40.5	2.787	0.454	0.553

# CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

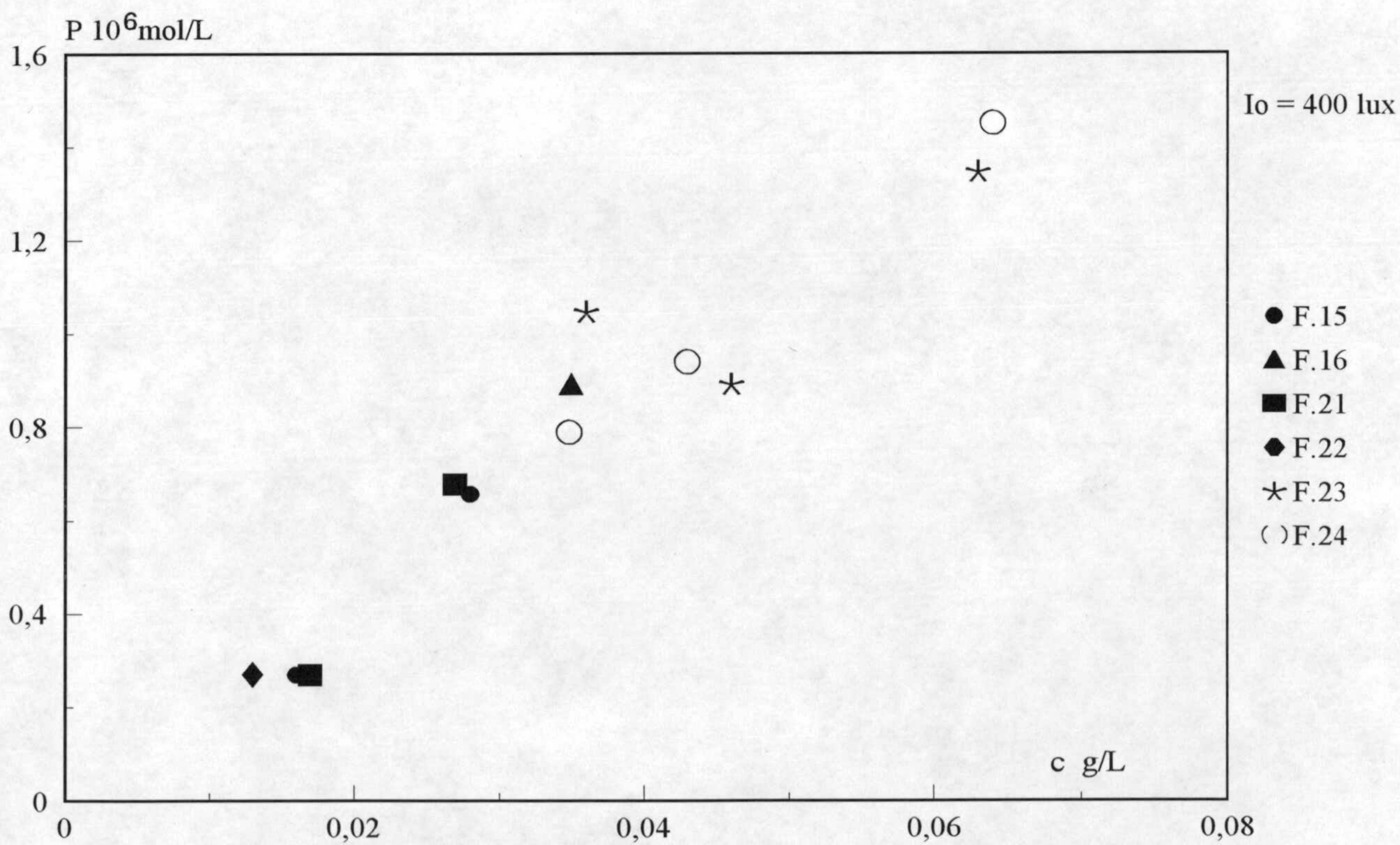
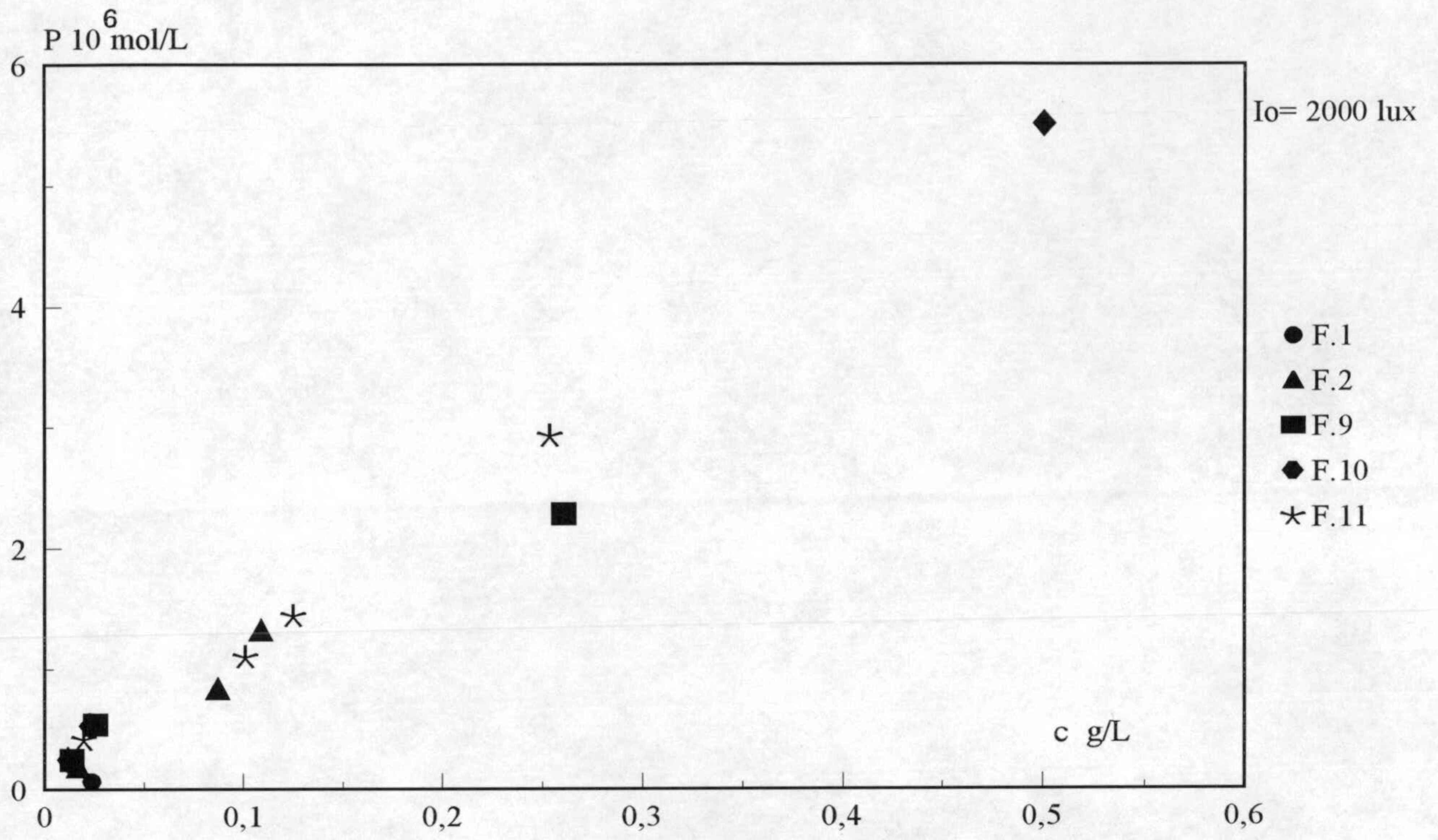


FIG. 6.18

# CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

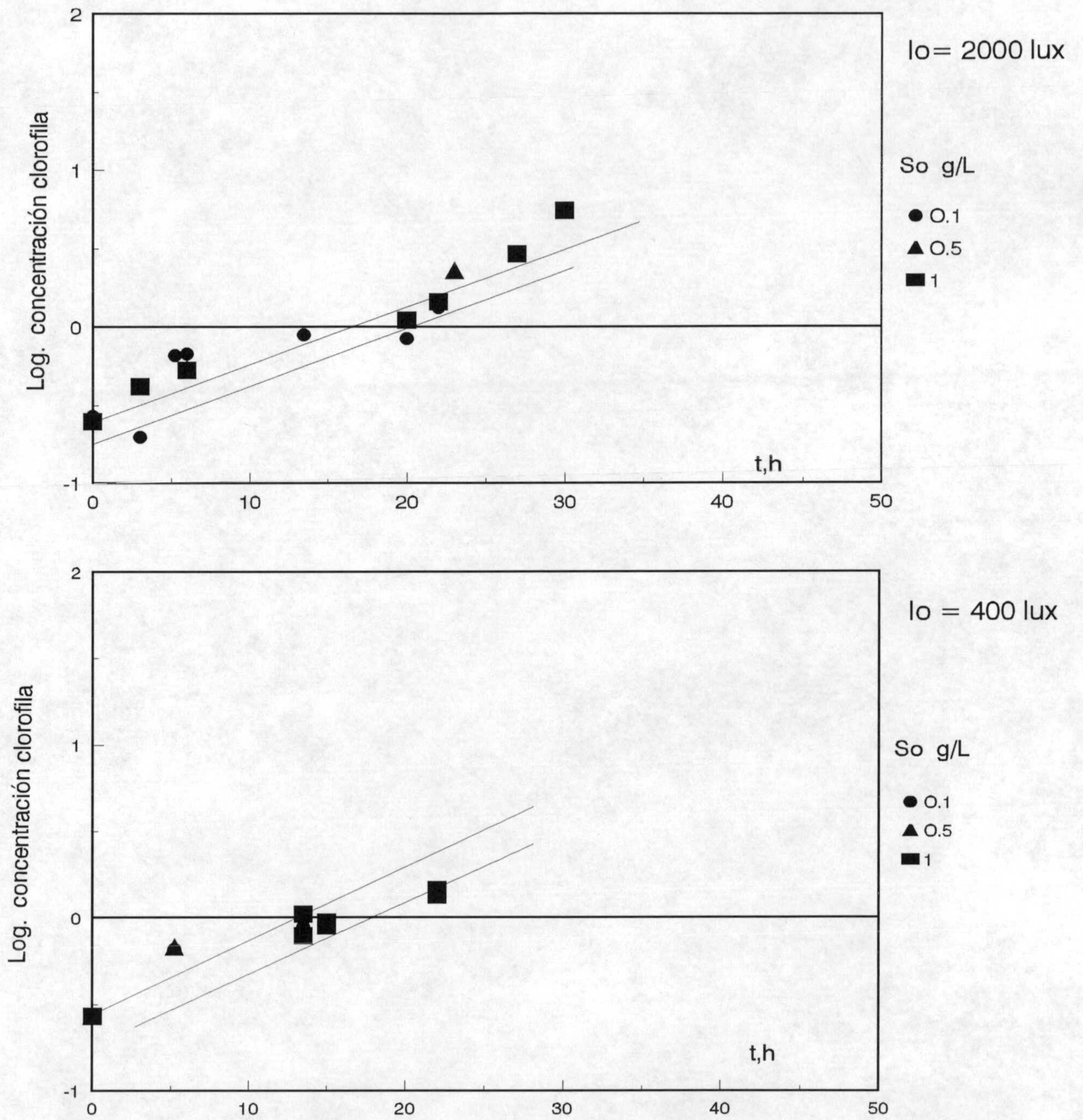


FIG. 6.19

experimentos seleccionados, pone de manifiesto un aumento exponencial de la misma. Este aumento no depende significativamente de la concentración inicial de glucosa ni de la intensidad de iluminación incidente, las distintas líneas en la Fig 6.19 corresponden a experimentos con concentraciones iniciales distintas.

Al igual que en crecimiento mixotrófico se han calculado las velocidades específicas de síntesis de clorofila por ajuste por regresión lineal de los valores

$P = e^{\mu t}$  a la ec. [6.12].

En la Figura 6.20 se indica esta variación lineal para los experimentos realizados al nivel máximo y mínimo de  $I_0$  y en la Tabla 6.27 los valores de  $q_p$  y  $r^2$  obtenidos en los ajustes.

Para cada nivel de iluminación, no hay una tendencia clara de modificación de  $q_p$  con  $S_0$ , Así los valores se han promediado por grupos y estos valores medios también aparecen en la tabla. La tendencia de estos valores es a aumentar al disminuir la intensidad de iluminación si bien la variación es inferior a la existente entre valores de un mismo grupo por lo que esto parece indicar una constancia de  $q_p$  con  $I_0$ .

Comparando estos resultados con los obtenidos en el crecimiento mixotrófico se observa que en general son menores aunque del mismo orden de magnitud. Debe tenerse presente que el método de cálculo utilizado para  $q_p$ , ecuación [6.12], permite obtener el valor medio de este parámetro durante la zona exponencial de crecimiento.

En el cultivo fotoheterotrófico la concentración de clorofila por unidad de biomasa permanece prácticamente constante como ya se ha indicado y los valores de  $q_p$  y  $\mu_m$  deben ser proporcionales, por lo que al ser constante  $\mu_m$  lo será también  $q_p$ . Por el contrario en el crecimiento mixotrófico la concentración de clorofila por unidad de biomasa aumenta con el tiempo y por tanto los valores de  $q_p$  indicados en la Tabla 6.12 son promedios de valores de  $q_p$  crecientes.

TABLA 6.32

Crecimiento Fotoheterotrófico

VELOCIDADES ESPECIFICAS DE SINTESIS DE CLOROFILA

$I_0, \text{lux}$	$S_0, \text{g/L}$	$q_p, \frac{\text{mol clorofila}}{\text{g biomasa.h}} \cdot 10^6$	$r^2$
=====	=====	=====	====
1963	0.1	0.9801	0.982
1955	0.5	0.8975	0.959
1938	1	1.4518	0.977
		<b>1.1098</b>	<b>valor medio</b>
1461	0.1	2.9630	0.999
1427	0.5	0.9979	0.999
1351	1	1.3085	0.999
		<b>1.7565</b>	<b>valor medio</b>
429	0.1	2.0040	0.917
436	0.5	3.3528	0.999
412	1	1.0936	0.883
		<b>2.1501</b>	<b>valor medio</b>

# CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

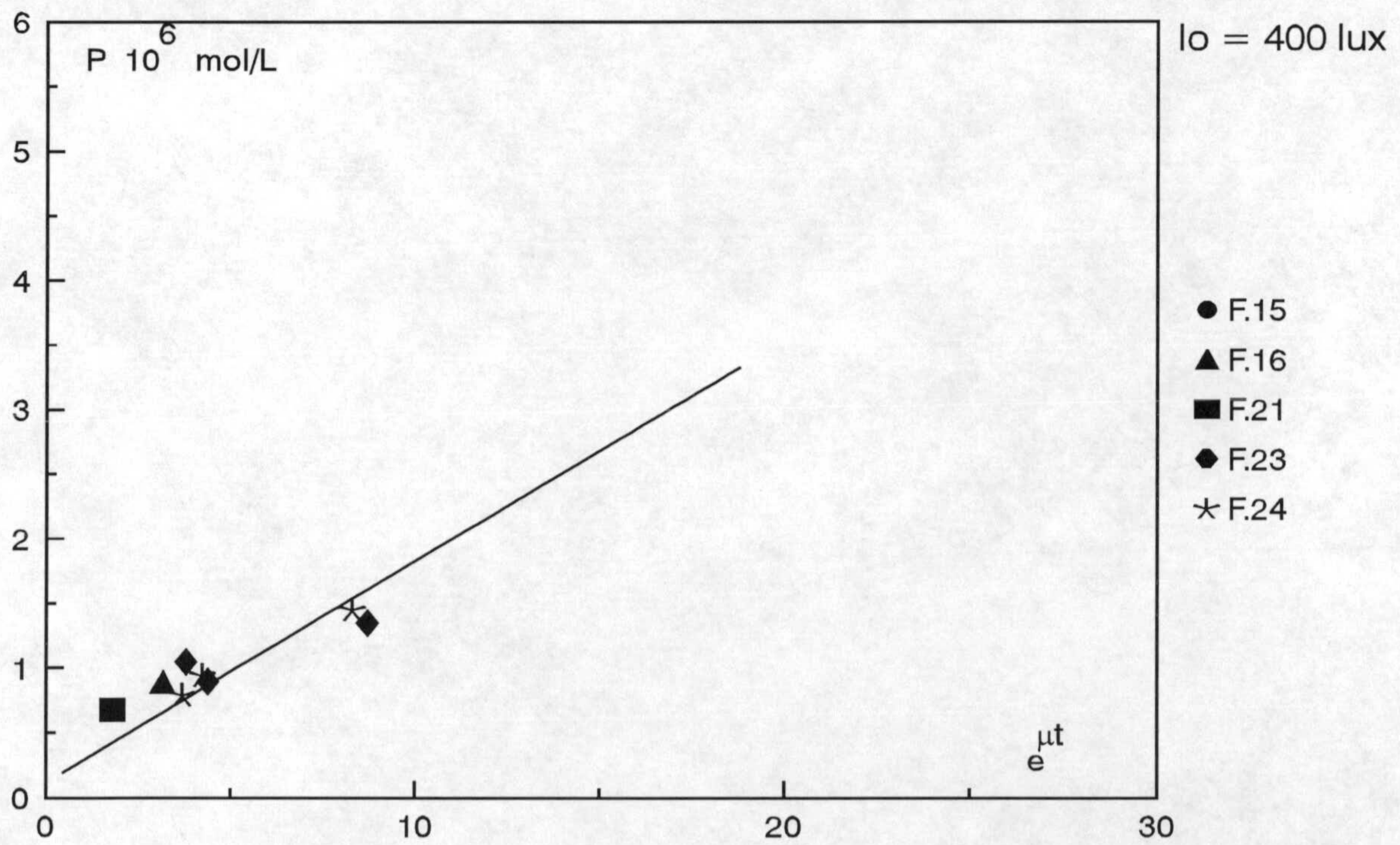
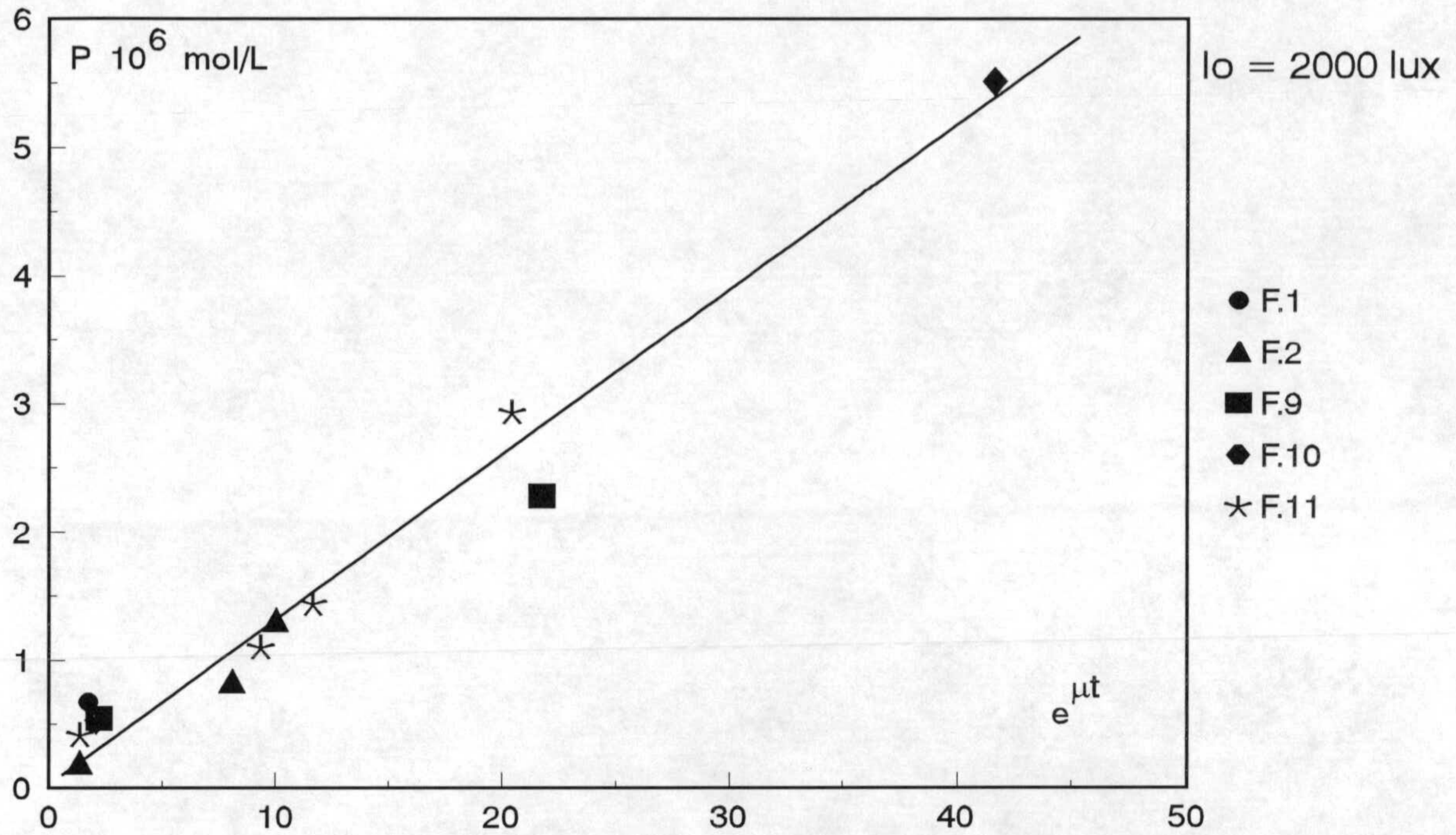


FIG. 6.20



## 6.2.4 CONSUMO DE SUSTRATO

En la Tabla 6.28 se recogen los valores de la concentración residual de glucosa,  $S$ , expresada en mg/L, frente al tiempo,  $t$ , en horas para los experimentos de crecimiento fotoheterotrófico. Cada grupo de resultados recoge los valores experimentales correspondientes a cultivos realizados en iguales condiciones ambientales, la primera columna identifica cada experimento. Estos valores se han representado en las Figuras 6.21 y 6.22 en coordenadas semilogarítmicas

### 6.2.4.1. Velocidad específica de consumo de sustrato

Las velocidades específicas de consumo de sustrato se han determinado por ajuste mediante regresión no lineal de los valores experimentales  $S$ - $t$  a la ecuación [6.14]. Los valores  $S_t$  recogidos en las Tablas 6.28 representan los valores teóricos de  $S$  obtenidos mediante el ajuste anterior y con ellos se han trazado las líneas continuas de las Figuras 6.21 y 6.22.

En la Tabla 6.29 se indican las velocidades específicas de consumo de glucosa,  $q_s$ , y los coeficientes  $p$ - $r^2$  obtenidos en los ajustes.

A un mismo nivel de intensidad de iluminación  $q_s$  no parece variar con la concentración inicial de glucosa, por ello se han calculado los valores medios que aparecen en la tabla.

TABLA 6.28

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

	EXPTO.	t,h	S,mg/L	S <sub>t</sub> ,mg/L
I <sub>o</sub> =2000 lux		0	100	95.5976
	F.2	3	88.40	92.2973
So= 100 mg/L	F.1	6	87.00	87.8169
Co = 0.0093 g/L	F.2	20	34.30	33.9880
μ= 0.1019 h <sup>-1</sup>				

---

EXPTO.	t,h	S,mg/L	S <sub>t</sub> ,mg/L	
	0	500	493.8947	I <sub>o</sub> =2000 lux
F.9	6	458.0	481.79	
PHF.4	20	369.0	378.01	So = 500 mg/L
PHF.4	22	390.0	343.265	Co = 0.0095 g/L
PHF.4	27	189.0	209.035	μ =0.1207 h <sup>-1</sup>

---

	EXPTO.	t,h	S,mg/L	S <sub>t</sub> ,mg/L
I <sub>o</sub> =2000 lux		0	1000	1000
	F.11	22	900	896.156
So = 1000 mg/L	F.10	23	928	879.258
Co= 0.0105 g/L	F.11	27	756	787.656
μ = 0.1181 h <sup>-1</sup>				

TABLA 6.28(Continuación)

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

	EXPTO.	t,h	S,mg/L	S <sub>t</sub> ,mg/L
I <sub>o</sub> = 400 lux		0	100	96.085
	F.15	5.25	88.16	90.343
So= 100 mg/L	F.16	18	51.00	56.892
Co = 0.0122 g/L	F.16	21	43.00	41.495
μ= 0.092 h <sup>-1</sup>	F.16	22	38	35.343

---

	EXPTO.	t,h	S,mg/L	S <sub>t</sub> ,mg/L
I <sub>o</sub> = 400 lux		0	1000	998.129
	F.23	18	946	951.111
So = 1000 mg/L	F.23	22	927	923.768
Co= 0.011 g/L				
μ = 0.0985 h <sup>-1</sup>				

# CRECIMIENTO FOTOHETEROTRÓFICO

Intensidad de iluminación máxima

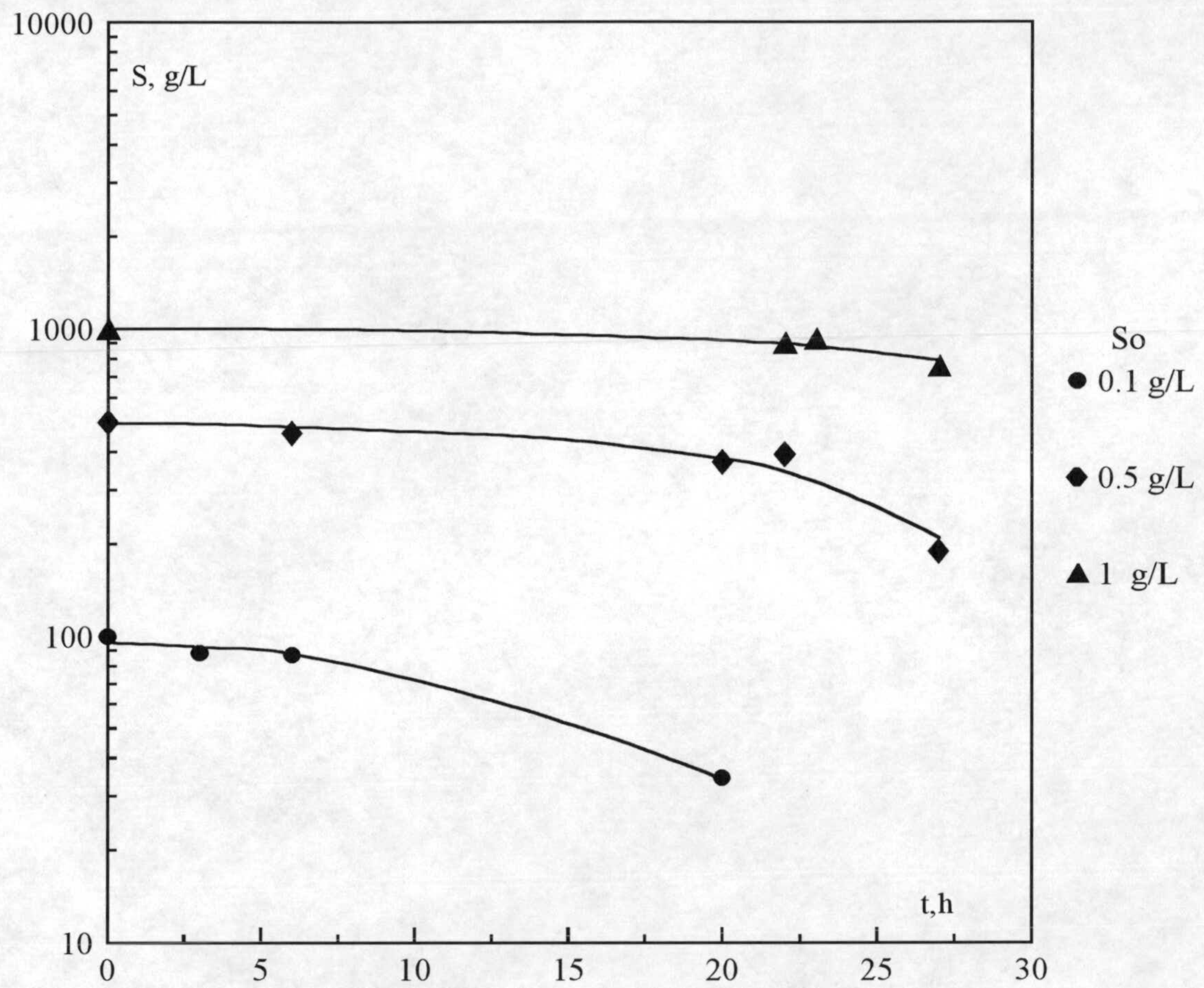


FIG. 6.21

# CRECIMIENTO FOTOHETEROTRÓFICO

Intensidad de iluminación mínima

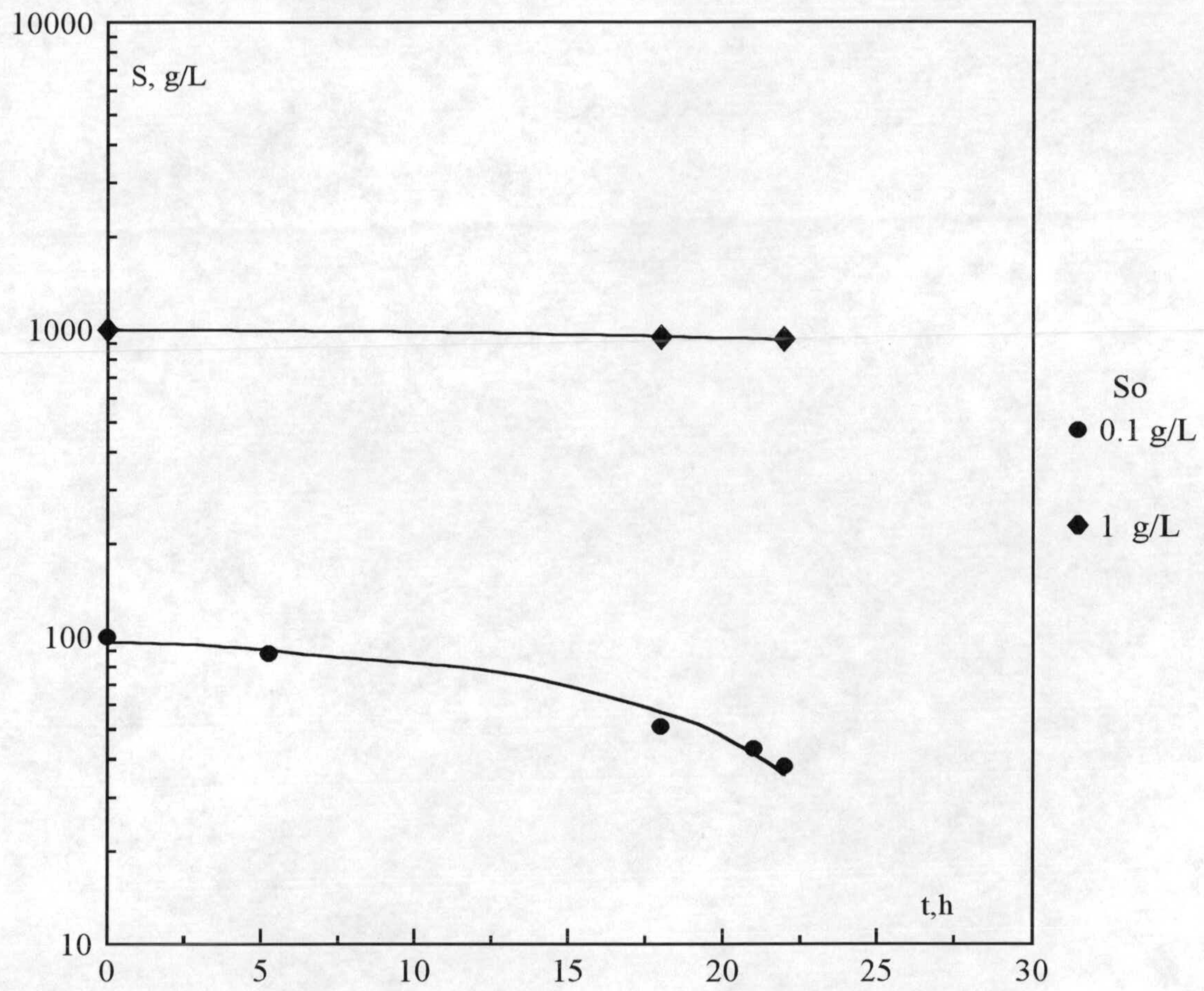


FIG. 6.22

TABLA 6.29

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

$I_0$ , lux	$S_0$ , mg/L	$q_s$ , mg/g h	$p-r^2$
2000	100	101.12	0.986
	500	144.64	0.943
	1000	112.81	0.878
	valor medio 119.52		
400	100	69.70	0.980
	1000	86.10	0.986
	valor medio 77.90		

Al disminuir la intensidad de iluminación disminuye la velocidad específica de consumo de sustrato. Este resultado no parece lógico y dado que a intensidades de iluminación pequeñas hay poca información experimental, no parece prudente tenerlo en consideración.

Si es interesante comparar el valor medio  $q_s$  a intensidad máxima, 120mg/g h con el obtenido en las mismas condiciones para el crecimiento mixotrófico de 55 mg/g h , evidentemente al no aportar  $CO_2$  en el crecimiento fotoheterotrófico el consumo específico de glucosa es mayor ya que al menos la glucosa se utiliza como fuente de carbono.

## 6.2.5 RENDIMIENTOS

### 6.2.5.1 Rendimiento en biomasa

Se ha determinado al agotarse la glucosa en el medio de cultivo, según la ecuación [6.15].

Los valores de rendimiento global,  $Y$ , g biomasa seca/g glucosa se indican en la Tabla 6.30 para cada concentración inicial de glucosa e intensidad inicial de iluminación. En esta Tabla para un mismo valor de  $S_0$  e  $I_0$  se han incluido varios experimentos, indicándose la letra y número identificativo de los mismos y los correspondientes valores de  $C_m$  y  $C_0$ .

Los rendimientos medios se han representado en la Figura 6.23 frente a la intensidad inicial de iluminación  $I_0$ , pudiendo trazarse una curva independiente para los experimentos realizados a  $S_0 = 0.1$  g/L y otra para la variación  $Y-I_0$  a  $S_0 = 0.5$  y 1 g/L.

Los rendimientos,  $Y$ , mayores se alcanzan a la concentración inicial de glucosa de 0.1 g/L y aumentan conforme la intensidad inicial de iluminación va creciendo. De forma lenta hasta aproximadamente  $I_0 = 1500$  lux y rápidamente a partir de este valor.

Los valores de  $Y$ , para las concentraciones iniciales de glucosa de 0.5 y 1 g/L siguen un comportamiento similar aunque no es apreciable cambio alguno hasta una intensidad de iluminación del orden de 1400 lux. A partir de esta intensidad de iluminación se observa un ligero aumento en el rendimiento.



TABLA 6.30

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

RENDIMIENTOS EN BIOMASA

EXPTO	S <sub>O</sub> , g/L	I <sub>O</sub> ,lux	C <sub>m</sub> , g/L	C <sub>O</sub> , g/L	Y, g/g
F.2	0.1	1963	0.187	0.008	1.79
F.3	0.1	1963	0.174	0.015	1.59
F.7	0.1	1938	0.161	0.015	1.46
			<b>Valor medio</b>	<b>=</b>	<b>1.61</b>
F.12	0.1	1461	0.088	0.012	0.76
			<b>Valor medio</b>	<b>=</b>	<b>0.76</b>
F.15	0.1	429	0.069	0.016	0.53
F.17	0.1	429	0.054	0.012	0.42
			<b>Valor medio</b>	<b>=</b>	<b>0.475</b>
F.9	0.5	1955	0.306	0.014	0.584
PHF.4	0.5	1955	0.399	0.008	0.782
			<b>Valor medio</b>	<b>=</b>	<b>0.683</b>
F.13	0.5	1427	0.213	0.015	0.396
			<b>Valor medio</b>	<b>=</b>	<b>0.396</b>
F.21	0.5	436	0.200	0.017	0.366
			<b>Valor medio</b>	<b>=</b>	<b>0.366</b>
F.10	1	1938	0.531	0.012	0.519
F.11	1	1938	0.580	0.009	0.571
			<b>Valor medio</b>	<b>=</b>	<b>0.545</b>
F.14	1	1355	0.378	0.015	0.363
			<b>Valor medio</b>	<b>=</b>	<b>0.363</b>
F.22	1	400	0.352	0.013	0.339
F.23	1	400	0.488	0.011	0.477
F.24	1	436	0.486	0.012	0.474
			<b>Valor medio</b>	<b>=</b>	<b>0.430</b>

### Crecimiento Fotoheterotrófico

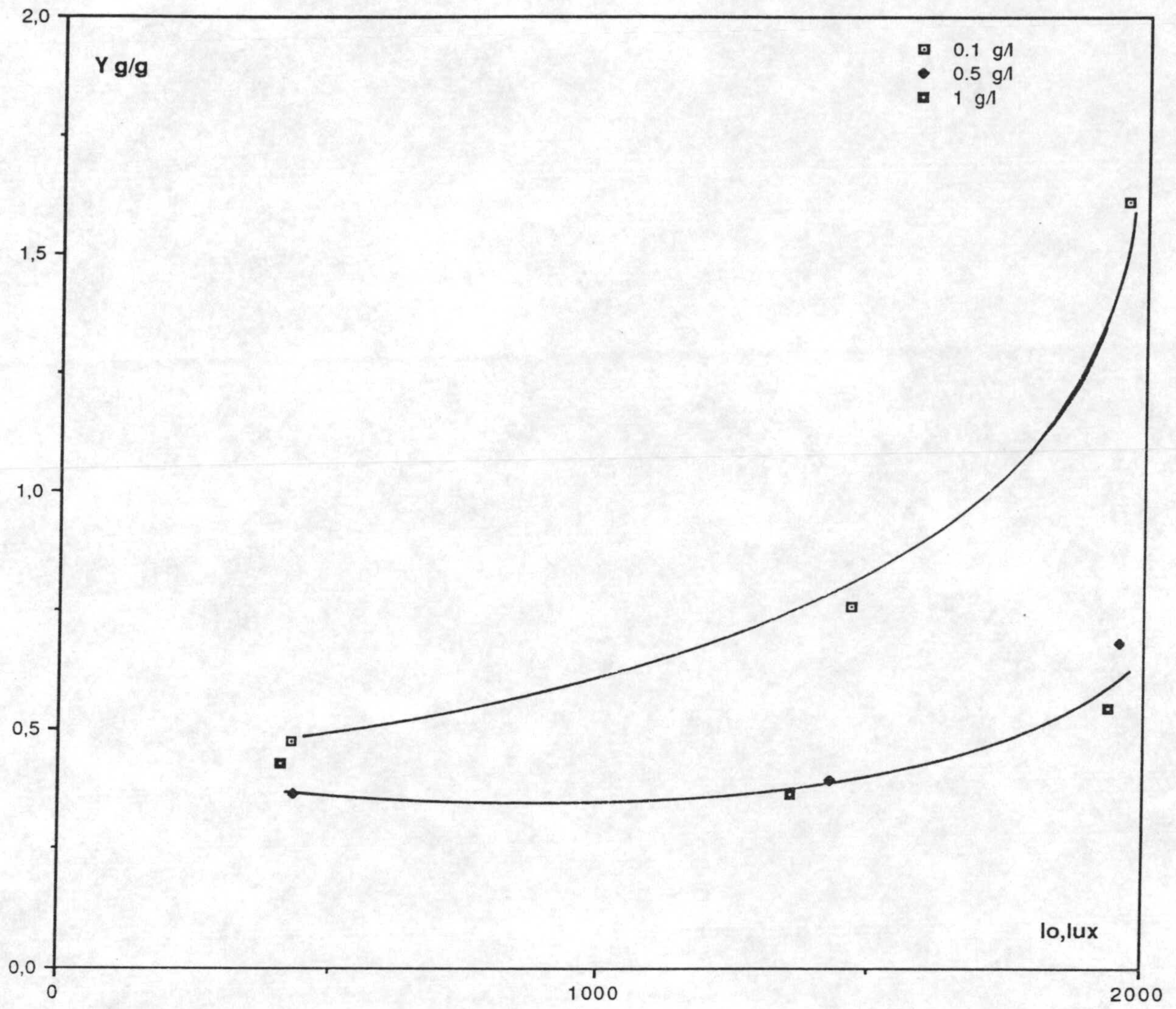


Fig. 6.23

A intensidades de iluminación pequeñas los valores de  $Y$ , son muy parecidos para las tres concentraciones iniciales de glucosa consideradas y al igual que en crecimiento mixotrófico tienden a un valor único de  $Y$  para  $I_0=0$  de aproximadamente 0.3 g/g.

En la Tabla 6.31 se indican los valores de biomasa neta formada a distintos tiempos de cultivo y los correspondientes consumos de glucosa, precisos para el cálculo de los rendimientos instantáneos.

Estos valores se han representado en la Figura 6.24 y 6.25 para dos niveles de intensidad de iluminación inicial.

El hecho de que para una misma intensidad de iluminación, todos los valores  $(C - C_0)$  frente a  $(S_0 - S)$  queden alineados, indica que al igual que ocurría en crecimiento mixotrófico los rendimientos instantáneos durante el crecimiento exponencial son constantes e independientes de la concentración de glucosa inicial en el medio de cultivo.

Los rendimientos  $Y_S$ , calculados, Tabla 6.32, aumentan al aumentar la intensidad de iluminación y son inferiores a los obtenidos en crecimiento mixotrófico, Tabla 6.18.

Con objeto de esclarecer el papel de la luz en este crecimiento se han comparado en la ecuación [6.19] los términos  $q_S$  y  $(1/Y_S) \mu$  habiéndose encontrado la desigualdad  $0.120 < 0.126$ , lo que indica que la luz soporta el mantenimiento pero que puede haber fijación de dióxido de carbono que será muy ligera ya que la glucosa constituye el 95.2 % de la biomasa formada

TABLA 6.31

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

So = 0.1 g/L		Io ≈ 2000 lux			
EXPTO.	t,h	C, g/L	C <sub>0</sub> , g/L	C-C <sub>0</sub> , g/L	So-S,mg/L
F.3	3.00	0.017	0.008	0.009	11.6
F.2	19.75	0.087	0.008	0.079	65.7
So = 0.5 g/L		Io ≈ 2000 lux			
F.9	5.25	0.026	0.014	0.012	42.0
PHF.4	19.75	0.098	0.008	0.090	131.0
PHF.4	21.75	0.125	0.008	0.117	110.1
PHF.4	27.00	0.266	0.008	0.258	311.1
So = 1 g/L		Io ≈ 2000 lux			
F.11	21.75	0.125	0.009	0.134	100.0
F.10	22.25	0.147	0.012	0.135	72.0
F.11	27.00	0.254	0.009	0.245	244.0
F.10	29.50	0.501	0.012	0.489	979.0
So = 0.1 g/L		Io ≈ 400 lux			
F.15	5.00	0.028	0.016	0.012	11.8
So = 1 g/L		Io ≈ 400 lux			
F.23	18.00	0.050	0.011	0.039	54.00
F.23	21.00	0.063	0.011	0.052	73.00

# CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

$I_0 = 2000 \text{ lux}$

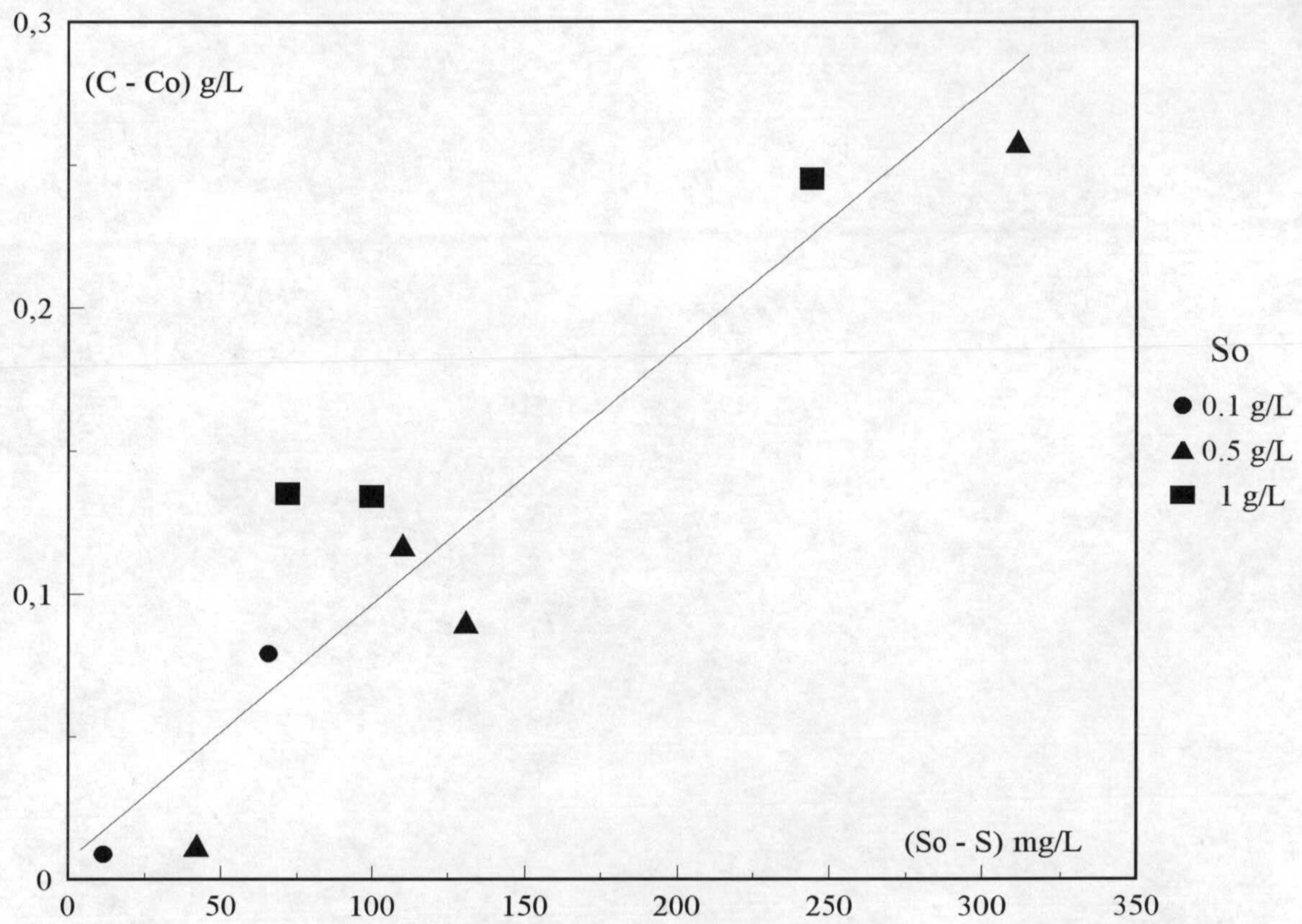


FIG. 6.24

# CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

$I_0 = 400 \text{ lux}$

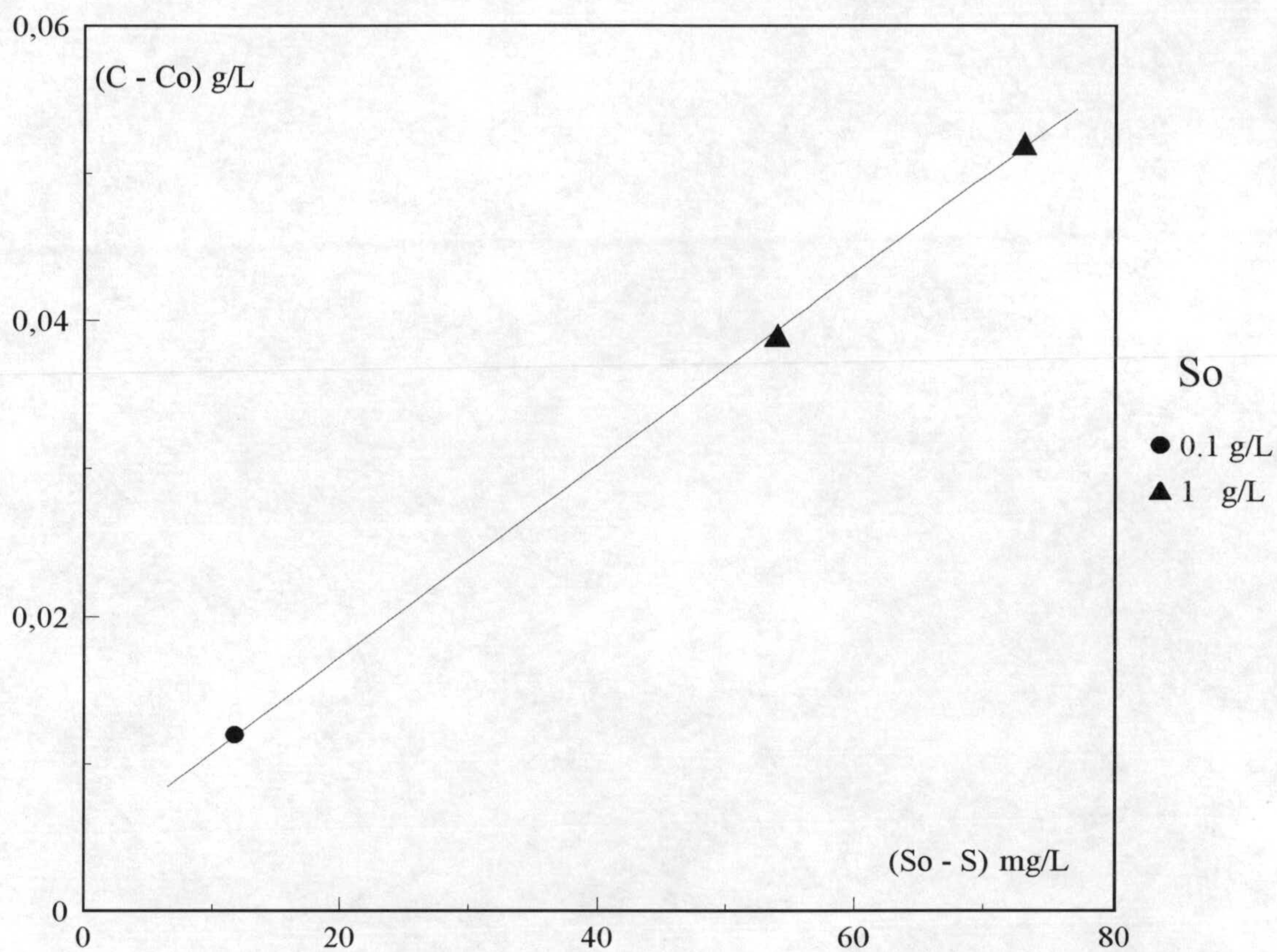


FIG. 6.25

TABLA 6.32

CRECIMIENTO FOTOHETEROTROFICO

RENDIMIENTO EN BIOMASA

$I_0$ , lux	$Y_S$ , g / g	$r^2$
2000	0.86	0.940
400	0.41	0.995

6.2.5.2 Estudio estequiométrico

Se ha seguido el mismo procedimiento de cálculo utilizado en la sección 6.1.4.2 . Los resultados obtenidos han sido:

$I_0$ ,lux	$Y_S$ ,g/g	$y_c$	d	a	c	b
2000	0.86	1.1094	-0.1094	0.1331	0.0792	-0.4976
400	0.41	0.5289	0.4711	0.0635	0.5610	0.2859

A 2000 lux se confirma la fijación de dióxido de carbono (-0.1094) y el desprendimiento de oxígeno (-0.4976).

### 6.3. CRECIMIENTO ANAEROBIO

Los valores de las velocidades específicas de crecimiento anaerobio están reflejados en la Tabla 6.33 correspondientes a los experimentos A.1 a A.6 realizados a la máxima intensidad de iluminación y a concentraciones de glucosa de 0.1;0.5;1,4,6 y 10 g/L.

#### 6.3.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA

En la Figura 6.26 se ha representado en coordenadas lineales los valores de la velocidad específica de crecimiento,  $\mu$ , frente a la concentración inicial de sustrato  $S_0$ .

En el margen de concentración de glucosa estudiado, no se observa influencia de la concentración del sustrato sobre la velocidad específica de crecimiento, siendo el valor medio  $\mu_m = 0.119 \text{ h}^{-1}$

El valor obtenido para la velocidad específica de crecimiento en la zona exponencial coincide prácticamente con los correspondientes al crecimiento mixotrófico y fotoheterotrófico lo que confirma la conclusión indicada en el apartado 6.2.2 de que el valor de  $\mu_m$  está determinado por la utilización de la luz para mantenimiento y el sustrato orgánico como fuente de carbono para la biosíntesis

Hay poca información bibliográfica acerca de velocidades específicas de crecimiento en condiciones anaerobias. Se dispone solo de un valor de  $\mu_m$  de  $0.29 \text{ h}^{-1}$  publicado por Kreuzberg y obtenido a una temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , una concentración de acetato de 10mM para el alga *Chlorogonium elongatum*.



TABLA 6.33

CRECIMIENTO ANAEROBIO

VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

EXPTO	$I_0, \text{lux}$	$S_0, \text{g/L}$	$\mu, \text{h}^{-1}$	$r^2$
A.1	2108	0.1	0.1213	0.975
A.2	2131	0.5	0.1131	0.991
A.3	1933	1	0.1245	0.996
A.4	2027	4	0.1177	0.999
A.5	1991	6	0.1168	0.999
A.6	1914	10	0.1226	0.999

# ANAEROBIO

$I_0 = 2000 \text{ LUX}$

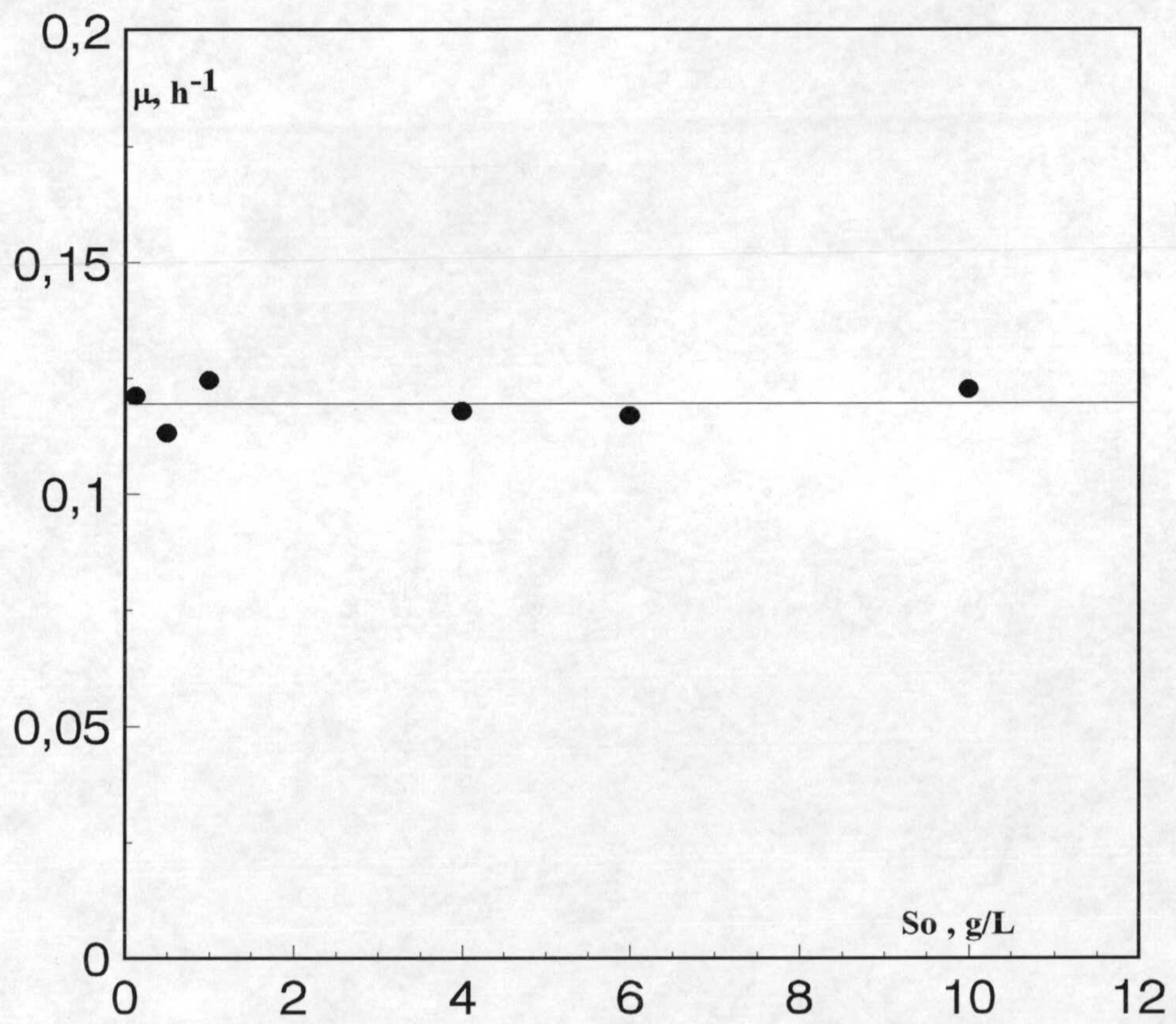


FIG. 6.26

### 6.3.2 CONTENIDO EN CLOROFILA

La Tabla 6.34 recoge los datos necesarios para el análisis de la formación de clorofila durante el crecimiento anaerobio de *Chlorella pyrenoidosa*, a seis concentraciones iniciales de glucosa distintas.

La concentración de clorofila total, P, aumenta en el tiempo, no así el contenido por unidad de biomasa, %CHL, que puede considerarse invariable en el tiempo a las concentraciones iniciales de glucosa de 0.1; 0.5 y 1 g/L y que experimenta una disminución continua a valores de  $S_0 \geq 4$  g/L, una vez acabada la zona exponencial de crecimiento.

En la Figura 6.27 se ha representado la variación en el tiempo de la clorofila total para los experimentos realizados a una misma intensidad de iluminación incidente y concentraciones iniciales de glucosa de 4,6 y 10 g/L. Se observa un aumento exponencial de P en el tiempo, durante las zonas de crecimiento exponencial, al finalizar estas zonas la concentración de clorofila en el cultivo es tanto mayor cuanto menor es la concentración de glucosa.

Las velocidades específicas de síntesis de clorofila, para aquellos experimentos en que ha sido posible, se han calculado por ajuste por regresión lineal a la ecuación [6.12], encontrándose los valores de  $q_p$  recogidos en la tabla 6.35.

Las diferencias no son significativas y el valor medio obtenido coincide prácticamente con los correspondientes a los dos crecimientos anteriores.

La Figura 6.28 es la representación gráfica del ajuste realizado en el experimento A.5

TABLA 6.34.

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO A.1  $S_0 = 0.1 \text{ g/L}$   $I_0 = 2108 \text{ lux}$

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
7	0.551	0.031	1.601
24	1.775	0.088	1.816
26	1.777	0.090	1.778
32.5	1.806	0.091	1.787

EXPTO A.2  $S_0 = 0.5 \text{ g/L}$   $I_0 = 2131 \text{ lux}$

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
7	0.677	0.034	1.793
24	3.052	0.243	1.131
26	3.727	0.266	1.262
32.5	4.767	0.263	1.632

EXPTO A.3  $S_0 = 1 \text{ g/L}$   $I_0 = 1933 \text{ lux}$

t,h	P. $10^6$ mol/L	C, g/L	% CHL
7	0.544	0.031	1.580
24	2.586	0.248	0.939
26	3.261	0.282	1.041
32.5	7.154	0.403	1.599

TABLA 6.34 Continuación

CONTENIDO EN CLOROFILA

EXPTO A.4  $S_0 = 4$  g/L  $I_0 = 2027$  lux

t,h	P.10 <sup>6</sup> mol/L	C, g/L	% CHL
7.5	0.742	0.036	1.856
24.5	3.033	0.259	1.055
27.75	4.110	0.383	0.966
31.50	6.342	0.598	0.955
50.75	8.744	1.459	0.540

EXPTO A.5  $S_0 = 6$  g/L  $I_0 = 1991$  lux

t,h	P.10 <sup>6</sup> mol/L	C, g/L	% CHL
7.5	0.637	0.053	1.082
24.50	2.838	0.356	0.718
27.75	4.314	0.547	0.710
31.50	6.439	0.869	0.667
50.75	6.019	1.258	0.431

EXPTO A.6  $S_0 = 10$  g/L  $I_0 = 1914$  lux

t,h	P.10 <sup>6</sup> mol/L	C, g/L	% CHL
7.5	0.698	0.037	1.699
24.5	2.882	0.281	0.924
27.75	3.461	0.416	0.749
31.50	5.363	0.747	0.647
50.75	6.386	1.240	0.464

# CRECIMIENTO ANAEROBIO

$I_0 = 2000 \text{ lux}$

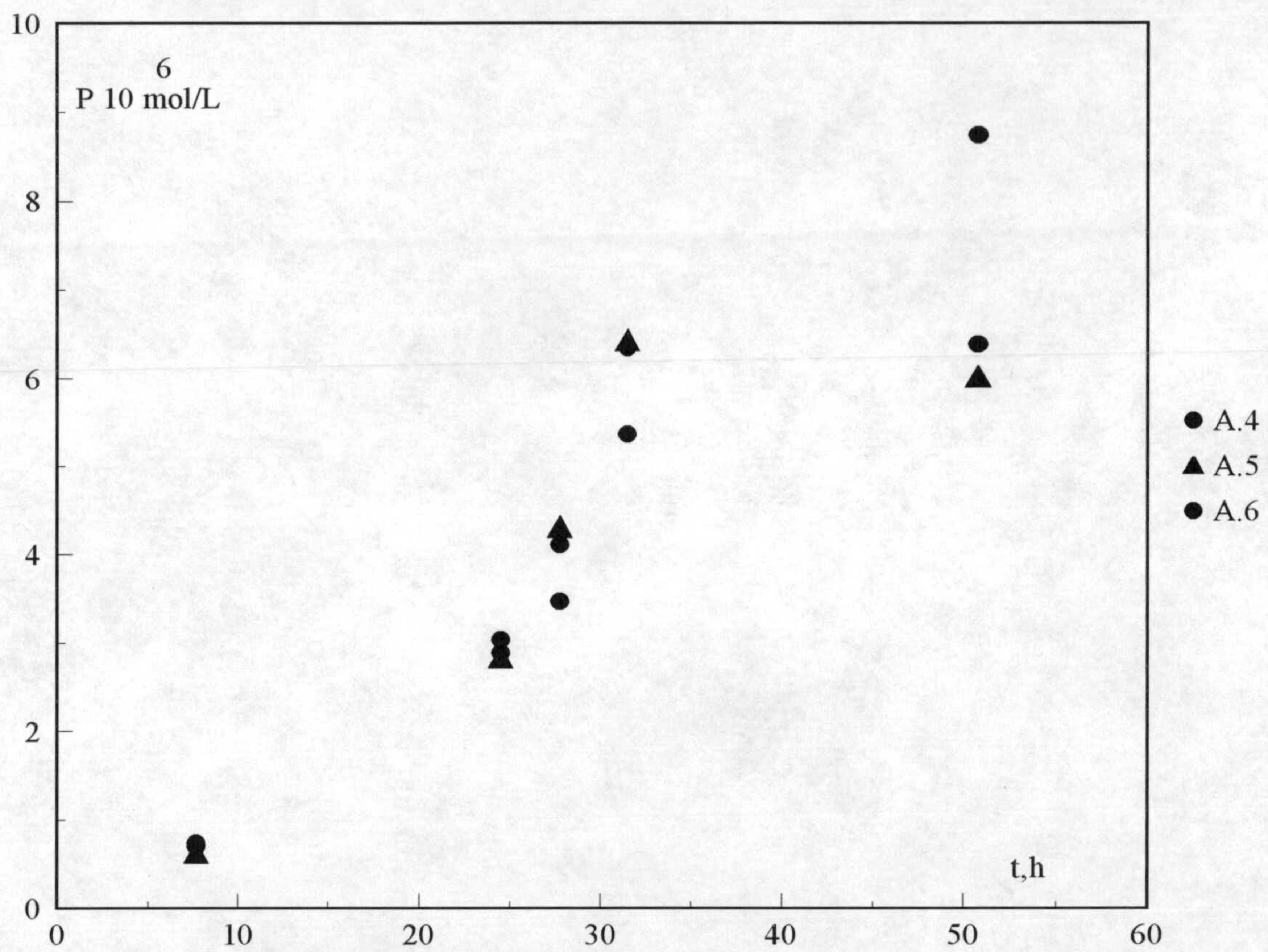


FIG. 6.27

TABLA 6.35

Crecimiento Anaerobio

VELOCIDADES ESPECIFICAS DE SINTESIS DE CLOROFILA

I <sub>o</sub> ,lux	S <sub>o</sub> ,g/L	q <sub>p</sub> , $\frac{\text{mol clorofila}}{\text{g biomasa.h}} \cdot 10^6$	r <sup>2</sup>
=====	=====	=====	=====
1933	1	1.1203	1
2027	4	1.3154	0.9994
1991	6	1.0793	0.9986
1914	10	1.0371	0.9898

valor medio = 1.1380

### CRECIMIENTO ANAEROBIO

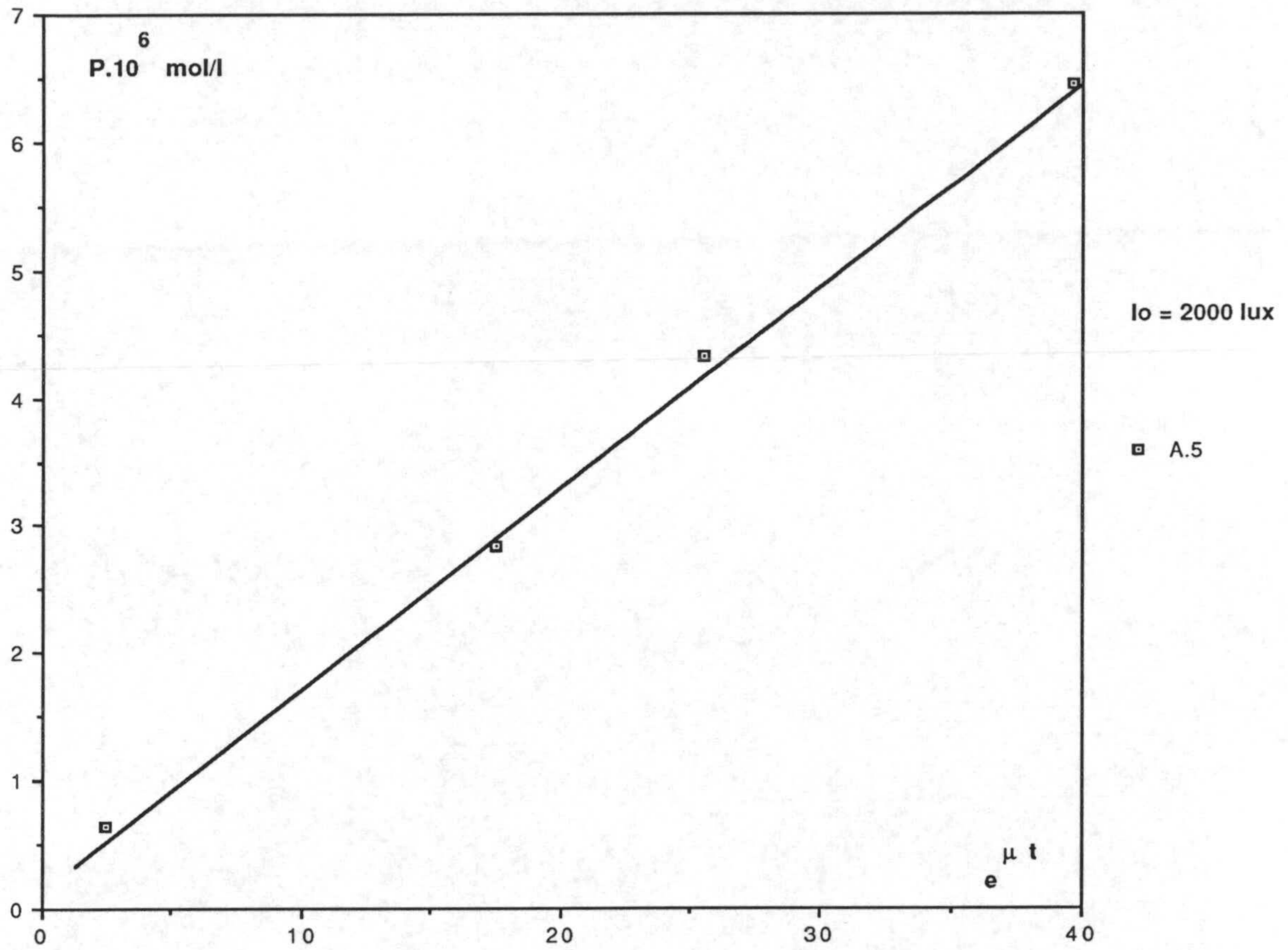


FIG. 6.28



### 6.3.3. CONSUMO DE SUSTRATO

En la Tabla 6.36 se indican los valores de la concentración residual de glucosa, S, expresada en mg/L, frente al tiempo, t, en horas para los experimentos de crecimiento anaerobio. La intensidad de iluminación es la máxima utilizada en nuestros experimentos, 2000 lux y la concentración de glucosa varía entre 0.1 g/L y 10 g/L. Los valores experimentales se han representado en coordenadas semilogarítmicas en la Figura 6.29.

#### 6.3.3.1. Velocidad específica de consumo de sustrato

De manera análoga a lo realizado en condiciones mixotróficas y fotoheterotróficas se han ajustado los valores experimentales S-t a la ecuación [6.14] mediante regresión no lineal.

En la Tabla 6.37 se indican las velocidades específicas de consumo de glucosa y los coeficientes de regresión,  $p$ -  $r^2$ .

TABLA 6.36

CRECIMIENTO ANAEROBIO

EXPTO A.1	<u>t,h</u>	<u>S,mg/L</u>	<u>St,mg/L</u>
Io= 2108 lux	0	100	101.21
So= 100 mg/L	4	86.9	85.05
Co = 0.015 g/L	8.5	53.9	54.54
$\mu = 0.1213 \text{ h}^{-1}$			

---

EXPTO A.2	<u>t,h</u>	<u>S,mg/L</u>	<u>St,mg/L</u>
Io= 2131lux	0	500	500.66
So= 500 mg/L	2	499	498.22
Co = 0.015 g/L	8.5	485	485.12
$\mu = 0.1131 \text{ h}^{-1}$			

---

EXPTO A.3	<u>t,h</u>	<u>S,mg/L</u>	<u>St,mg/L</u>
Io= 1933 lux	0	1000	997.50
So= 1000 mg/L	2	999	989.37
Co = 0.013 g/L	26	232	284.45
$\mu = 0.1245 \text{ h}^{-1}$	28	115	74.56

TABLA 6.36 Continuación  
CRECIMIENTO ANAEROBIO

EXPTO A.4	<u>t,h</u>	<u>S,mg/L</u>	<u>St,mg/L</u>
Io= 2027 lux	0	4000	3904.23
So= 4000 mg/L	26.25	3110	3208.54
Co = 0.013 g/L	27.25	3029	3117.50
$\mu= 0.1177 \text{ h}^{-1}$	31.50	2627	2585.30
	33.50	2276	2226.73
-----			
EXPTO A.5	<u>t,h</u>	<u>S,mg/L</u>	<u>St,mg/L</u>
Io= 1991 lux	0	6000	5745.62
So= 6000 mg/L	26.25	4601	4957.45
Co = 0.017 g/L	27.25	4817	4855.02
$\mu= 0.1168 \text{ h}^{-1}$	31.50	4133	4257.78
	33.50	4121	3856.14
-----			
EXPTO A.6	<u>t,h</u>	<u>S,mg/L</u>	<u>St,mg/L</u>
Io= 1914 lux	0	10000	9663.37
So=10000 mg/L	8.5	9754	9610.37
Co = 0.012 g/L	26.25	8575	8970.69
$\mu= 0.1226 \text{ h}^{-1}$	27.25	8409	8876.57
	31.50	8389	8318.82
	33.50	8250	7937.17

CRECIMIENTO ANAEROBIO

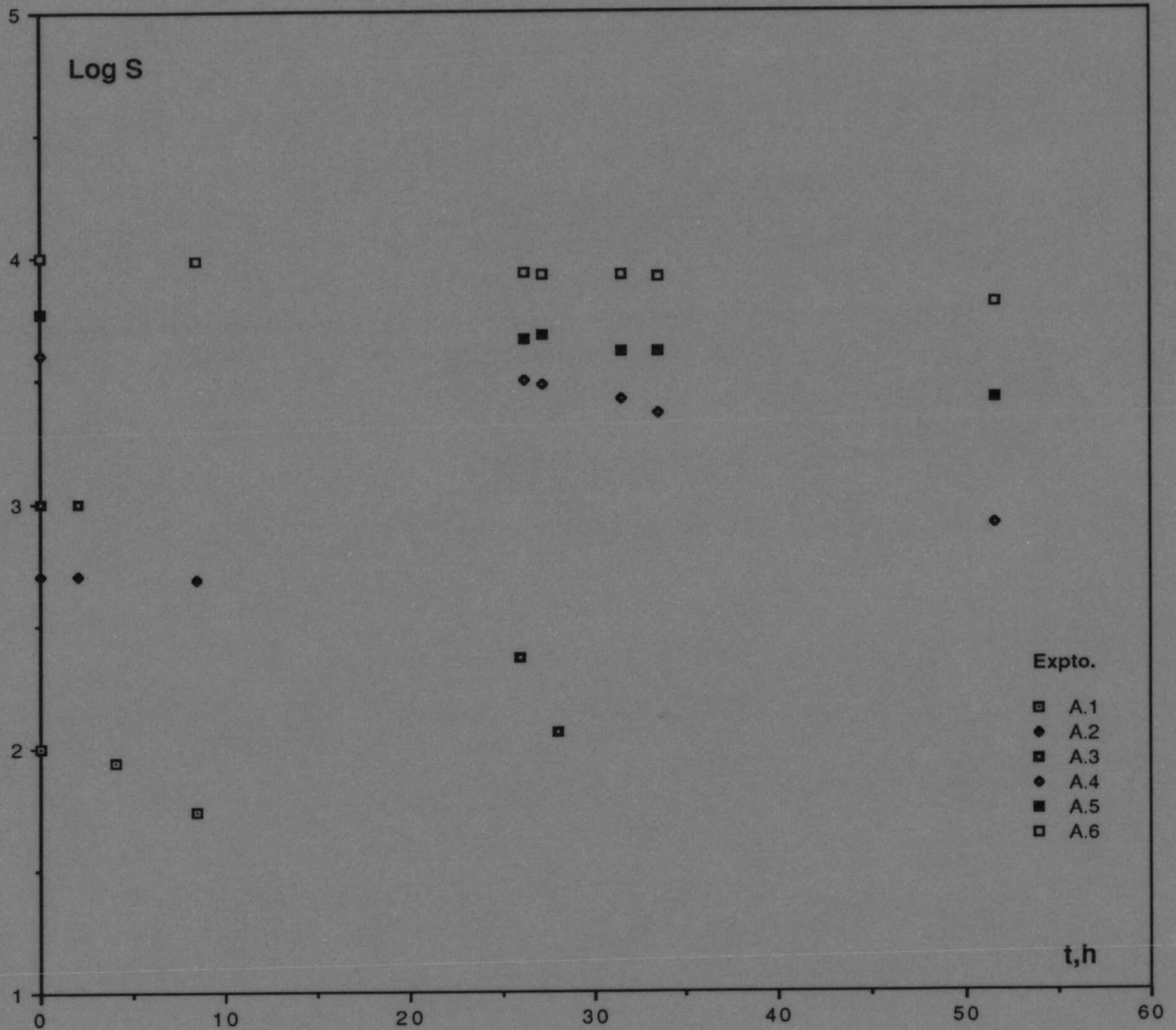


FIG. 6.29

TABLA 6.37

CRECIMIENTO ANAEROBIO

$I_0, \text{lux}$	$S_0, \text{mg/L}$	$q_s, \text{mg/g h}$	$p-r^2$
2108	100	209.20	0.995
2131	500	72.52	0.992
1933	1000	279.26	0.993
2027	4000	300.38	0.981
1991	6000	264.73	0.882
1914	10000	295.06	0.794

Valor medio = 269.73

Los valores de  $q_s$  obtenidos, salvo a  $S_o = 500$  mg/L, son del mismo orden de magnitud, y no parecen variar de acuerdo con ninguna tendencia. Por ello se ha calculado el valor medio de  $q_s$  que también se incluye en la Tabla 6.37.

A la máxima intensidad de iluminación utilizada de 2000 lux el consumo específico de glucosa es mayor en condiciones anaerobias que en fotoheterotróficas y mixotróficas.

#### 6.3.4 RENDIMIENTO

##### 6.3.4.1 Rendimiento en biomasa

Dado que en la mayoría de los experimentos realizados en crecimiento anaerobio, al finalizar la zona de crecimiento exponencial no se había consumido totalmente la glucosa, se ha procedido directamente al cálculo de los rendimientos instantáneos,  $Y_S$ , durante esta zona haciendo uso de los datos de formación de biomasa y consumo de sustrato. Estos valores se indican en la Tabla 6.38 y se han representado en coordenadas lineales en la Figura 6.30.

Todos los valores  $(C - C_0)$ , quedan alineados frente a  $(S_0 - S)$ , lo que indica que durante la zona de crecimiento exponencial el rendimiento instantáneo es constante e independiente de la concentración de glucosa.

El valor de la pendiente,  $Y_S$ , determinado por regresión lineal ha sido:

$$Y_S = 0.46 \text{ g biomasa /g glucosa}$$

con un coeficiente de regresión lineal  $r^2 = 0.989$ .

Al calcular y comparar los términos  $q_s$  y  $(1/Y_S) \mu$  de la ecuación [6.19] se ha encontrado la desigualdad  $0.270 > 0.259$  lo que indica que en crecimiento anaerobio la luz es incapaz de soportar el mantenimiento celular y se consume glucosa para tal fin.

TABLA 6.38

CRECIMIENTO ANAEROBIO

So = 0.1 g/L		Io ≈ 2108 lux				
EXPTO	t,h	C, g/l	C <sub>o</sub> , g/l	(C-C <sub>o</sub> ) g/l	(S <sub>o</sub> -S),mg/L	
A.1	4.00	0.023	0.015	0.008	13.1	
A.1	8.50	0.038	0.015	0.023	46.1	
So = 0.5 g/L		Io ≈ 2131 lux				
A.2	2.00	0.018	0.015	0.003	1.0	
A.2	8.50	0.039	0.015	0.024	15.0	
So = 1 g/L		Io ≈ 1933 lux				
A.3	2.00	0.016	0.013	0.003	1	
A.3	26.00	0.282	0.013	0.024	768	
A.3	28.00	0.322	0.013	0.309	885	
So = 4 g/L		Io ≈ 2027 lux				
A.4	26.25	0.317	0.013	0.304	890	
A.4	27.25	0.346	0.013	0.333	971	
A.4	31.50	0.598	0.013	0.585	1373	
A.4	33.50	0.782	0.013	0.769	1724	



TABLA 6.38 Continuación

CRECIMIENTO ANAEROBIO

So = 6 g/L    Io ≈ 1991 lux

A.5	27.25	0.492	0.017	0.475	1183
A.5	31.50	0.869	0.017	0.852	1867
A.5	33.50	0.934	0.017	0.917	1879

So = 10 g/L    Io ≈ 1914 lux

A.6	8.50	0.041	0.012	0.029	246
A.4	31.50	0.747	0.012	0.735	1611
A.4	33.50	0.837	0.012	0.815	1750

# CRECIMIENTO ANAEROBIO

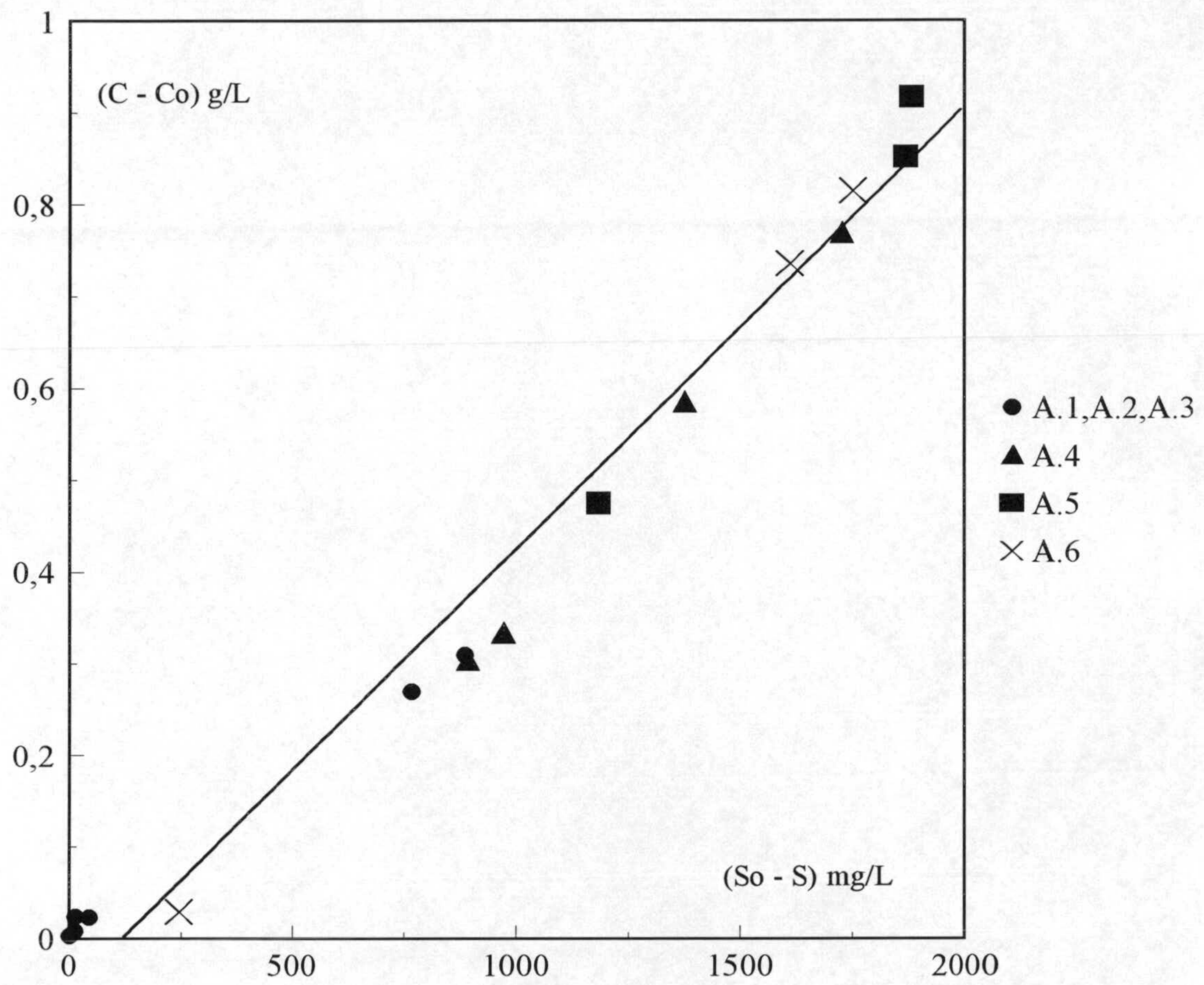


FIG. 6.30

#### 6.4 INFLUENCIA DEL INHIBIDOR DCMU

En el apartado 5.4 de esta Memoria se recogieron los datos primarios de los experimentos realizados utilizando DCMU como inhibidor de la fotosíntesis.

De los datos experimentales expuestos en las Tablas 5.22 y 5.23 se obtienen las velocidades específicas de crecimiento  $\mu$  y rendimientos,  $Y$ , que se indican en la Tabla 6.39

Para el crecimiento mixotrófico, experimentos IM.1, IM.2 y IM.3 se obtienen unas velocidades específicas de crecimiento similares para las tres concentraciones de glucosa utilizadas, la variación está dentro de los márgenes experimentales, para todo el crecimiento mixotrófico con inhibidor se tiene una velocidad específica de crecimiento media  $\mu_m = 0.0703 \text{ h}^{-1}$ .

En el crecimiento anaerobio ocurre algo similar siendo la velocidad media para este crecimiento de  $\mu_m = 0.0753 \text{ h}^{-1}$ .

La diferencia entre la velocidad específica de los crecimientos mixotrófico y anaerobio no es significativa y está dentro del rango de variación normal, por lo que se puede dar una velocidad específica de crecimiento para todos los experimentos realizados con DCMU de  $0.0728 \text{ h}^{-1}$ , velocidad que es inferior a la  $\mu$  media obtenida para los crecimientos sin inhibidor de la fotosíntesis, que es de  $0.1060 \text{ h}^{-1}$ .

La velocidad específica de crecimiento obtenida,  $0.0728 \text{ h}^{-1}$ , es del mismo orden que la encontrada por Sánchez (1986) para el crecimiento heterotrófico de *Chlorella pyrenoidosa*, lo que parece indicar que el DCMU inhibe completamente la influencia de la intensidad de iluminación sobre la velocidad específica de crecimiento, impidiendo la utilización de la luz tanto para la fijación de dióxido de carbono como para el mantenimiento.

TABLA 6.39

CRECIMIENTO CON DCMU

EXPTO	$I_0$ , lux	$S_0$ , g/L	$\mu$ , h <sup>-1</sup>	t, h *	$C_0$ , g/L	$C_m$ , g/L	Y g/g
IM.1	2108	0.1	0.0637	(12.25-21.25)	0.014	0.055	0.410
IM.2	2131	0.5	0.0692	(12.25-15.25)	0.020	0.204	0.366
IM.3	1933	1.0	0.0781	(12.25-15.25)	0.018	0.320	0.302
IA.4	2108	0.1	0.0709	(0 - 18 )	0.013	0.056	0.430
IA.5	2131	0.5	0.0822	(0 - 18 )	0.016	0.212	0.392
IA.6	1933	1.0	0.0729	(0 - 3.50 )	0.016	0.376	0.360

\* rango de tiempos en que se ha calculado  $\mu$

En cuanto al rendimiento global los valores obtenidos se aproximan al valor límite para el crecimiento heterotrófico de 0.33 g biomasa/ g glucosa.

## 6.5 INFLUENCIA DEL pH

Para estudiar la influencia del pH en los distintos tipos de crecimiento presentados en esta Memoria, se han analizado las velocidades específicas de crecimiento de experimentos realizados a distinto valor de pH.

### 6.5.1 VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO

A partir de los valores experimentales  $C, g/L - t, h$ , de los cultivos realizados: en crecimiento fotoheterotrófico a pH 3;4;5;6.5;7;7.5;8 y 8.5, a la concentración de glucosa de 0.5 g/L y  $T=30^{\circ}C$  cuyos resultados están en las Tablas 4.1 y 4.2, a pH 4 y concentraciones de glucosa de 0.1 y 1 Tabla 4.3, en crecimiento anaerobio, a pH 4 y concentraciones de sustrato 0.1;0.5; y 1 g/L Tabla 4.4 y en crecimiento mixotrófico a pH 5 y 7.5 y concentración de glucosa de 0.5 g/L, Tabla 4.5, se han calculado la velocidades específicas de crecimiento, que se expresan en la Tabla 6.40.

Como ya se indicó en el apartado 4.1 de esta Memoria los resultados indican que la influencia del pH sobre la velocidad específica de crecimiento no se afecta por la concentración de sustrato, al menos en el intervalo estudiado y se pone de manifiesto además que la influencia del pH es la misma para los tres tipos de crecimiento considerados y que el valor óptimo se alcanza aproximadamente a  $pH=6.5$ .

Los valores de  $\mu$ -pH se han representado en la Figura 6.31 para los distintos tipos de crecimiento. Para  $pH = 6.5$  se ha tomado para  $\mu$  el valor medio de todos los experimentos realizados a ese pH,  $0.106 h^{-1}$

TABLA 6.40

INFLUENCIA DEL pH

$I_0 = 2000 \text{ lux}$

EXPTO	pH	$S_0, \text{g/L}$	$\mu, \text{h}^{-1}$	$r^2$	Crecimiento
PHF.1	3.0	0.5	0.0371	0.9975	Fotohet.
PHF.2	4.0	0.1	0.0448	0.9992	Fotohet.
PHA.3	4.0	0.1	0.0514	0.9835	Anaerobio
PHF.4	4.0	0.5	0.0457	0.9969	Fotohet.
PHA.5	4.0	0.5	0.0467	0.9989	Anaerobio
PHF.6	4.0	1.0	0.0502	0.9944	Fotohet.
PHA.7	4.0	1.0	0.0463	0.9911	Anaerobio
PHM.8	5.0	0.5	0.0726		Mixotróf.
PHM.9	5.0	0.5	0.0771	0.9978	Mixotróf.
PHM.10	5.0	0.5	0.0736	0.9964	Fotohet.
PHF.11	7.0	0.5	0.1003	0.9919	Fotohet.
PHF.12	7.5	0.5	0.0951	0.9921	Fotohet.
PHM.13	7.5	0.5	0.0954	0.9994	Mixotróf.
PHM.14	8.0	0.5	0.0835	0.9967	Fotohet.
PHM.15	8.5	0.5	0.0788	0.9979	Fotohet.

A partir de pH 8.5 precipitan los componentes del medio de cultivo

TABLA 6.40

INFLUENCIA DEL pH

$I_0 = 2000 \text{ lux}$

EXPTO	pH	$S_{O_2}, \text{g/L}$	$\mu, \text{h}^{-1}$	$r^2$	Crecimiento
PHF.1	3.0	0.5	0.0371	0.9975	Fotohet.
PHF.2	4.0	0.1	0.0448	0.9992	Fotohet.
PHA.3	4.0	0.1	0.0514	0.9835	Anaerobio
PHF.4	4.0	0.5	0.0457	0.9969	Fotohet.
PHA.5	4.0	0.5	0.0467	0.9989	Anaerobio
PHF.6	4.0	1.0	0.0502	0.9944	Fotohet.
PHA.7	4.0	1.0	0.0463	0.9911	Anaerobio
PHM.8	5.0	0.5	0.0726		Mixotróf.
PHM.9	5.0	0.5	0.0771	0.9978	Mixotróf.
PHM.10	5.0	0.5	0.0736	0.9964	Fotohet.
PHF.11	7.0	0.5	0.1003	0.9919	Fotohet.
PHF.12	7.5	0.5	0.0951	0.9921	Fotohet.
PHM.13	7.5	0.5	0.0954	0.9994	Mixotróf.
PHM.14	8.0	0.5	0.0835	0.9967	Fotohet.
PHM.15	8.5	0.5	0.0788	0.9979	Fotohet.

A partir de pH 8.5 precipitan los componentes del medio de cultivo



# INFLUENCIA DEL pH

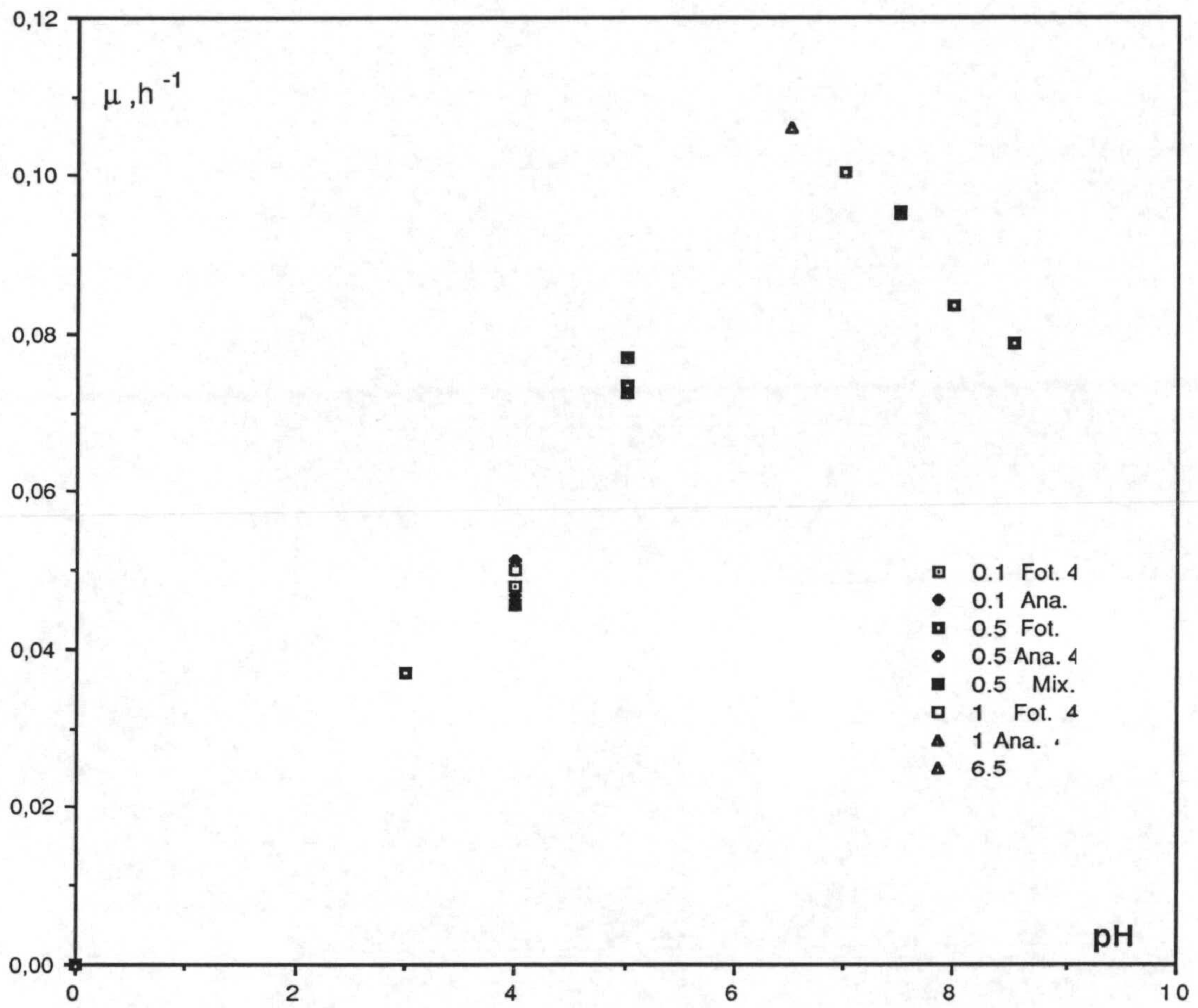


Fig. 6.31

Estos resultados coinciden con los indicados por Davis y cols. (1953) para crecimiento autotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* ya que señalan que las máximas velocidades de crecimiento se alcanzan en el intervalo de pH de 6 a 6.5.

Kreuzberg en el crecimiento anaerobio de *Chlorogonium elongatum* en un medio con acetato encuentra un pH óptimo de 6.8.

En crecimiento mixotrófico Ogawa y col. (1981) encuentran un pH óptimo de 6.0 para *Chlorella vulgaris*, Lalucats y cols(1984) de 7.0 para *Chlorella sp V179* y Samejima y col. (1958) de 5.6 a 5.8 para *Chlorella pyrenoidosa*.

Los valores obtenidos en esta investigación para los tres tipos de crecimiento estudiados coinciden con los encontrados por Sanchez (1986) para crecimiento heterotrófico de la misma en un medio con glucosa.

Los valores de  $\mu$ -pH se han tratado de ajustar a la ecuación, Moser(1985a):

$$\mu = \frac{\mu_0}{1 + \frac{a}{[H^+]} + b [H^+]}$$

[6.31]

Esta ecuación no permite el ajuste de todos los resultados obtenidos, ya que sólo suele ser aplicable para el crecimiento de microorganismos en intervalos estrechos de pH. Así excluyendo los valores extremos de pH 3;4 y 8.5 se obtienen mediante regresión no lineal, utilizando el programa estadístico BMDPAR, los siguientes valores para los parámetros:

$$\begin{aligned}\mu_0 &= 0.1054 \text{ h}^{-1} \\ a &= 2.7509 \cdot 10^{-9} \text{ M} \\ b &= 40503.3 \text{ M}^{-1} \\ \text{SSQ} &= 1.4622 \cdot 10^{-5}\end{aligned}$$

A partir de estos resultados puede calcularse el valor óptimo de pH :

$$[H^+]_{op} = \sqrt{a/b} \quad [6.32]$$

que resulta igual a 6.58. Sustituyendo este valor en la ecuación [6.31] se obtiene la velocidad específica correspondiente al óptimo que resulta ser de  $0.1032 \text{ h}^{-1}$  y que coincide en gran medida con la observada experimentalmente

## 6.6 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

La influencia de la temperatura sobre el crecimiento de *Chlorella* se ha analizado a través del efecto que ejerce sobre la velocidad específica de crecimiento.

Mediante los datos experimentales concentración de biomasa-tiempo, ya indicados en las Tablas 4.6 a 4.10 se han determinado las velocidades específicas de crecimiento que se muestran en la Tabla 6.41, donde se indican asimismo las condiciones experimentales utilizadas y el tipo de crecimiento estudiado.

Tal como se ha concluido en los apartados anteriores, se confirma aquí que para una temperatura dada no es significativa la influencia de la concentración de sustrato ni del tipo de crecimiento. Por ello se ha promediado la velocidad específica de crecimiento a cada temperatura, habiéndose tomado a 30 °C la media global determinada en apartados anteriores.

En la Figura 6.32 se han representado los valores medios obtenidos a cada temperatura, observándose que la curva pasa por un máximo en las proximidades de 30 °C., hecho muy similar al encontrado en Bibliografía tal como se comenta en el apartado 2 de esta Memoria.

Los valores de  $\mu$ -T se han ajustado a la ecuación de Moser (1985a):

$$\mu = \mu_0 e^{(-E_a/RT)} \cdot \mu_d e^{(-E_d/RT)} \quad [6.33]$$

en el intervalo de temperatura de trabajo de 25 a 35 °C. El ajuste se ha realizado utilizando el programa BMDPAR de regresión no lineal.

TABLA 6.41

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA  
I<sub>0</sub> 2000 lux

T, °C	So, g/L	μ, h <sup>-1</sup>	r <sup>2</sup>	crecimiento
25	0,1	0,0733	0,9817	Foto
25	1	0,0738	0,9865	Foto
27,5	0,5	0,0790	0,9915	Mixo
27,5	0,5	0,0800	0,9967	Anaerobio
32,5	0,1	0,0927	0,9984	Mixo
32,5	0,5	0,0964	0,9955	Mixo
32,5	0,5	0,0995	0,9981	Anaerobio
35	0,1	0,0932	0,9985	Mixo
35	0,5	0,0943	0,9638	Foto

TABLA 6.42

AJUSTE DE LOS VALORES MEDIOS μ-T  
POR REGRESION NO LINEAL

$$E_a = 13185 \text{ cal/mol} \quad \mu_0 = 6.395 \cdot 10^{18}$$

$$E_d = 14504 \text{ cal/mol} \quad \mu_d = 4.3791 \cdot 10^{20}$$

$$SSQ = 1.5628 \cdot 10^{-4}$$

T°C	Valores medios Experimentales, h <sup>-1</sup>	Valores Predichos, h <sup>-1</sup>
25	0,0736	0,0705
27,5	0,0795	0,0845
30	0,1060	0,0960
32,5	0,0962	0,1000
35	0,0937	0,0885

# INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

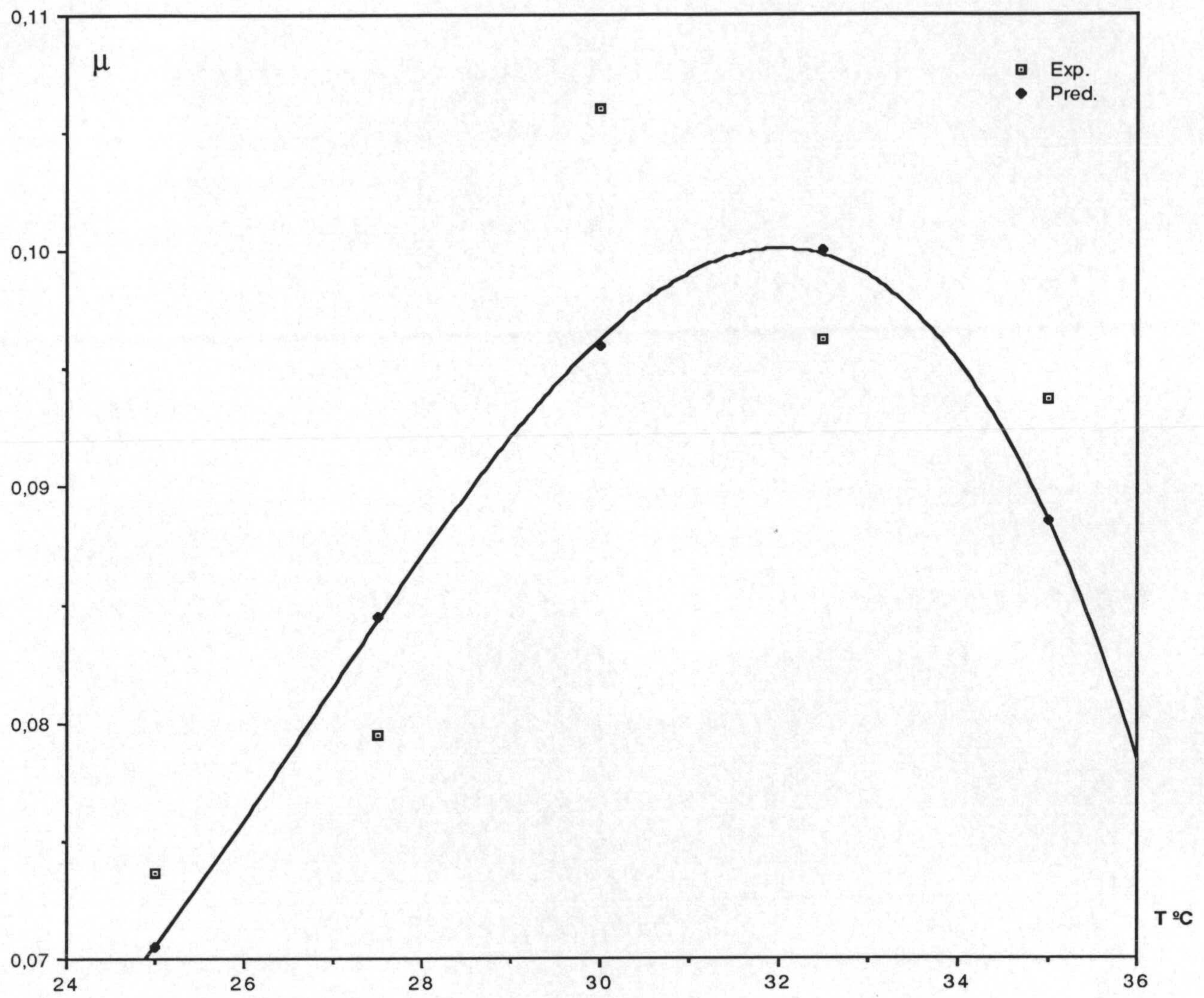


FIG 6.32

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.42 donde se indican las energías de activación aparente, antes del máximo,  $E_a$ , y después del máximo,  $E_d$ , así como el sumatorio de los cuadrados de los residuos SSQ y los valores experimentales de  $\mu$  junto con los predichos por el modelo. En la Figura 6.32 la línea continua representa el modelo teórico.

Como se observa el ajuste es aceptable, si bien se puede distinguir que el máximo se desplaza a temperaturas ligeramente superiores a 30°C.

Existe poca información acerca de las energías de activación aparente,  $E_a$ , para algas unicelulares en los tipos de crecimiento estudiados. La energía de activación aparente,  $E_a$ , encontrada 13185 cal/mol es del mismo orden que la expuesta por distintos autores tal como se indica en la Tabla 6.43, en la que aparecen valores de  $E_a$  para diversos microorganismos, otras algas en condiciones autotróficas y la misma alga en condiciones heterotróficas.

TABLA 6.43

ENERGIAS DE ACTIVACION DE CRECIMIENTO

Microorganismo	Intervalo T, °C	E <sub>a</sub> , Cal/mol	referencia
<i>Aspergillus nidulans</i>	20-37	14000	Pirt (1975)
<i>E.Coli</i>	12-26	28600	"
<i>E.Coli</i>	26-37	16200	"
<i>Klebsiella aerogenes</i>	20-40	14230	"
<i>Pseudomonas</i>	2-12	23800	"
<i>Chlorella Vulgaris</i> (211/8K) (Crecimiento autotrófico)..	-	13543	Lee y Cols (1984)
<i>Chlorogonium sp</i> (Crecimiento autotrófico)..	-	8780	"
<i>Chorella Pyrenoidosa</i> (Crecimiento heterotrófico)	20-35		
	So = 0,28 mM	18077	Sánchez (1984)
	So = 0,56 mM	27012	"



## 6.7 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL SUSTRATO ORGANICO

Con objeto de analizar la influencia de la naturaleza del sustrato orgánico en el crecimiento del alga *Chlorella pyrenoidosa* en presencia de luz, se han realizado experimentos con acetato y etanol a una concentración de 1mM en condiciones fotoheterotróficas, mixotróficas y anaerobias, a una temperatura de 30°C, intensidad luminosa de 2000 lux y pH 6.5 .

### 6.7.1 ACETATO

#### 6.7.1.1 Influencia de la concentración de acetato.

Dado que por investigaciones anteriores sobre crecimiento heterotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* , Sánchez (1986), se conoce que la máxima velocidad de crecimiento sobre acetato se produce a una concentración de 1mM, se ha explorado el intervalo de concentraciones de 0.25 a 10 mM con objeto de comprobar en primer lugar si este hecho se repetía en condiciones mixotróficas.

En la Tabla 6.44 se recogen las distintas concentraciones iniciales ensayadas y los valores de las velocidades específicas de crecimiento obtenidas. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un valor máximo para  $\mu$  , a  $S_0 = 1$  mM o a concentraciones próximas.

El hecho de que la velocidad específica disminuya a concentraciones superiores indica un cierto efecto de inhibición o toxicidad por parte del acetato.

TABLA 6.44

Influencia de la concentración de acetato

Crecimiento Mixotrófico

<u>So,mM</u>	<u><math>\mu, h^{-1}</math></u>
0.25	0.0780
0.50	0.0982
0.75	0.0959
1.00	0.1175
1.00	0.1130
3.00	0.0910
5.00	0.0789
10.00	0.0610

Las relaciones entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración de sustrato cuando existe inhibición o toxicidad son más complejas que las descritas por el modelo de Monod(1942) para crecimiento no inhibido. Entre los modelos recogidos por D' Adamo y col. (1984) se han ensayado los siguientes:

Inhibición por sustrato

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S + S^2/K_i} \quad [6.34]$$

Efecto tóxico del sustrato

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S} - k_d S \quad [6.35]$$

Inhibición por sustrato (modificado)

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S + S^3/K_i} \quad [6.36]$$

Efecto tóxico del sustrato (modificado)

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S} - K_d S^2 \quad [6.36]$$

Tipo Teissier

$$\mu = \mu_m [ \exp (-s/K_i) - \exp (-s/K_S) ] \quad [6.38]$$

Estas expresiones se reducen al modelo de Monod o de Teissier cuando el efecto inhibitorio no existe.

El ajuste de los valores experimentales  $\mu$ -So a los modelos indicado se ha realizado por regresión no lineal.

Como valores iniciales de  $K_S$ ,  $K_i$  y  $\mu_m$  se han utilizado los obtenidos en un primer ajuste por regresión polinomial de los valores experimentales a las ecuaciones [6.34] y [6.36] escritas en la forma, Szetela y cols.(1981).

$$\frac{S}{\mu} = \frac{1}{K_i \mu_m} S^2 + \frac{1}{\mu_m} S + \frac{K_S}{\mu_m} \quad [6.39]$$

$$\frac{S}{\mu} = \frac{1}{K_i \mu_m} S^3 + \frac{1}{\mu_m} S + \frac{K_S}{\mu_m} \quad [6.40]$$

Para las ecuaciones [6.35], [6.37] y [6.38] los valores iniciales se determinaron a partir de la pendiente en el origen de la curva  $\mu$ - $S_0$  y de las coordenadas del máximo de la misma curva.

Así para la ecuación [6.35] resulta:

$$(d\mu/ds)_{s=0} = \mu_m/K_S - k_d \quad [6.41]$$

$$S_{\text{máx}} = \sqrt{K_S \mu_m / K_d - K_S} \quad [6.42]$$

$$\mu_{\text{max}} = \frac{\mu_m S_{\text{max}}}{K_S + S_{\text{max}}} - k_d S_{\text{max}} \quad [6.43]$$

ecuaciones que por un método iterativo, dada su no linealidad, permiten una primera estimación de los parámetros  $\mu_m$ ,  $K_S$  y  $k_d$ .

Análogamente para la ecuación [6.37]

$$(d\mu/ds)_{s=0} = \mu_m/K_S \quad [6.44]$$

$$(K_S + S_{\max})^2 S_{\max} = K_S \mu_m / 2k_d \quad [6.45]$$

$$\mu_{\max} = \frac{\mu_m S_{\max}}{K_S + S_{\max}} - k_d S_{\max}^2 \quad [6.46]$$

y para la ecuación [6.38]

$$(d\mu/ds)_{s=0} = \mu_m \left[ 1/K_S - 1/K_i \right] \quad [6.47]$$

$$S_{\max} = \frac{\ln(K_i/K_S)}{1/K_S - 1/K_i} \quad [6.48]$$

$$\mu_{\max} = \mu_m \left[ \exp(-S_{\max}/k_i) - \exp(-S_{\max}/K_S) \right] \quad [6.49]$$

Aunque la determinación de las coordenadas del máximo a partir de la Figura 6.33, representación de los valores indicados en la Tabla 6.44, no es muy precisa el método converge bien obteniéndose los resultados finales que se indican en la Tabla 6.45 en la que junto a los valores de los parámetros obtenidos para cada uno de los modelos cinéticos ensayados, se indica también la suma de los cuadrados de las desviaciones con respecto a los resultados experimentales.

# INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ACETATO. MODELOS

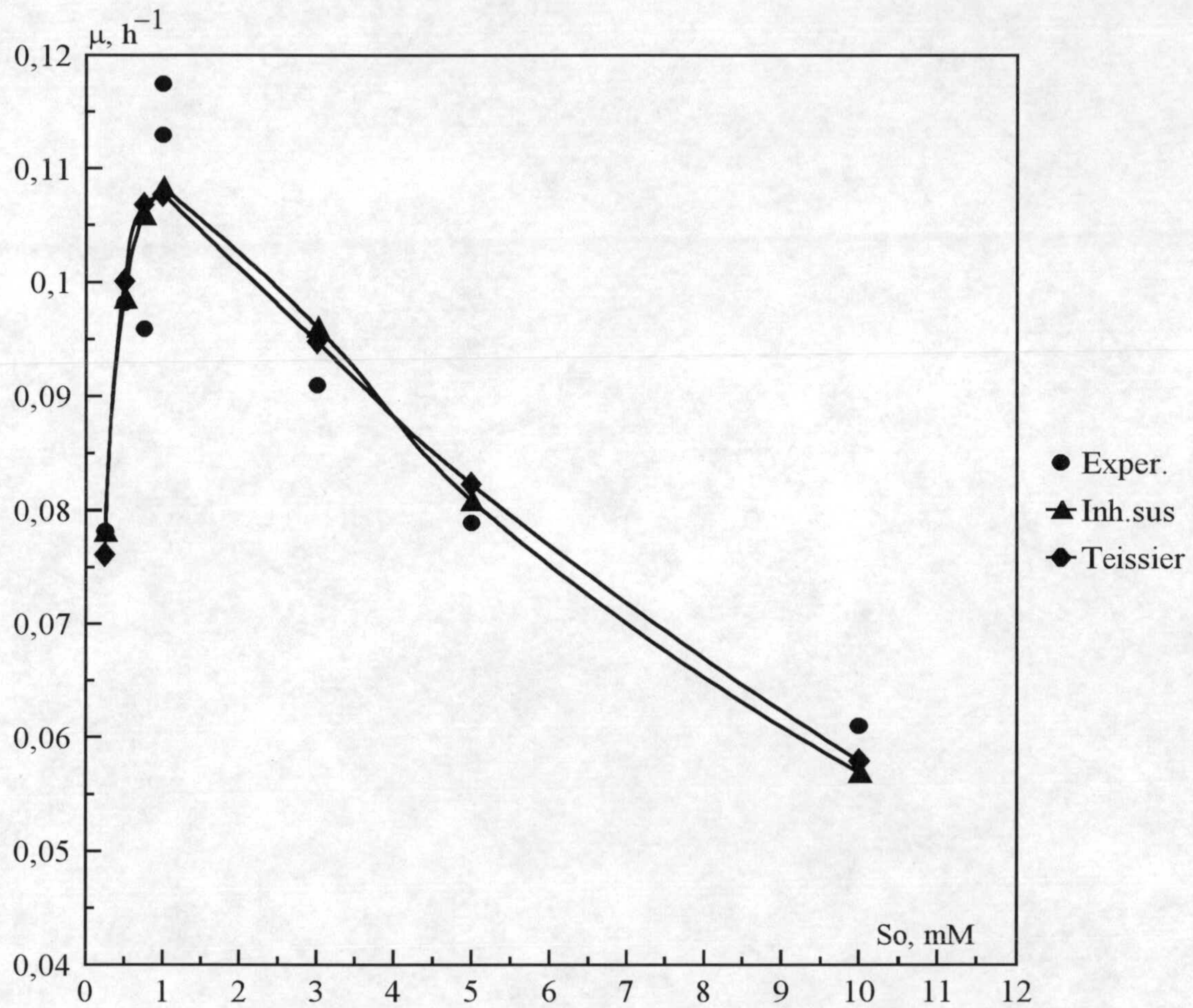


FIG. 6.33

TABLA 6.45

VALORES DE LOS PARAMETROS CINETICOS

INHIBICION POR SUSTRATO

$$\begin{aligned}\mu_m &= 0.1495 \text{ h}^{-1} \\ K_S &= 0.2180 \text{ mM} \\ K_i &= 6.21780 \text{ mM} \\ \text{SSQ} &= 2.5210 \cdot 10^{-4}\end{aligned}$$

TOXICIDAD

$$\begin{aligned}\mu_m &= 0.1234 \text{ h}^{-1} \\ K_S &= 0.1153 \text{ mM} \\ K_d &= 6.6843 \cdot 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1} \\ \text{SSQ} &= 4.8075 \cdot 10^{-4}\end{aligned}$$

INHIBICION POR SUSTRATO  
MODIFICADO

$$\begin{aligned}\mu_m &= 0.1160 \text{ h}^{-1} \\ K_S &= 0.09783 \text{ mM} \\ K_i &= 81.7077 \text{ mM}^2 \\ \text{SSQ} &= 5.6781 \cdot 10^{-4}\end{aligned}$$

TOXICIDAD  
MODIFICADO

$$\begin{aligned}\mu_m &= 0.1075 \text{ h}^{-1} \\ K_S &= 6.0557 \cdot 10^{-2} \text{ mM} \\ K_d &= 5.0186 \cdot 10^{-4} \text{ mM}^{-2} \text{ h}^{-1} \\ \text{SSQ} &= 8.3439 \cdot 10^{-4}\end{aligned}$$

TEISSIER

$$\begin{aligned}\mu_m &= 0.117160 \text{ h}^{-1} \\ K_i &= 0.2272 \text{ mM} \\ K_S &= 14.1804 \text{ mM} \\ \text{SSQ} &= 2.8880 \cdot 10^{-4}\end{aligned}$$

Los modelos que mejor reproducen la variación experimental son el de inhibición por sustrato y tipo Teissier que son los que presentan un menor valor de SSQ. En la Figura 6.33 se han trazado las líneas correspondientes a ambos modelos.

Uno de los escasos trabajos publicados sobre cultivo mixotrófico de *Chlorella* con acetato como sustrato orgánico corresponde a la especie de alta velocidad de crecimiento *Chlorella regularis* S -50, Endo y col. (1972). Estos autores trabajando en condiciones experimentales distintas de esta investigación, urea como fuente de nitrógeno y temperatura de 36 °C, encuentran que a una concentración de acético de 10 g/L y a bajas concentraciones celulares la velocidad específica máxima alcanza el valor de 0.45 h<sup>-1</sup> disminuyendo al aumentar la concentración celular hasta valores próximos al obtenido en crecimiento heterotrófico. Por otra parte es de destacar que estos autores en crecimiento heterotrófico indican que a 40 mM en acetato la inhibición del crecimiento es total mientras que la concentración de inhibición aumenta en presencia de luz ya que a 10g/L ó 55.5 mM el crecimiento es apreciable.

Estas observaciones son concordantes con las obtenidas en este laboratorio, por una parte las velocidades específicas de crecimiento son superiores a las obtenidas en crecimiento heterotrófico y por otra parte la inhibición se detecta a una mayor concentración cuando el alga crece en presencia de luz. En la Tabla 6.46 se indican las velocidades específicas de crecimiento y parámetros cinéticos para el crecimiento heterotrófico, Sanchez (1986). El menor valor de las constantes de inhibición implica un mayor efecto inhibidor del acetato en condiciones heterotróficas.



TABLA 6.46

CRECIMIENTO HETEROTROFICO

$S_0, \text{mM}$	$\mu, \text{h}^{-1}$
0.11	0.0162
0.22	0.0305
0.55	0.0394
0.70	0.0469
0.85	0.0476
1.20	0.0437
1.50	0.0414
3.00	0.0285

I. por Sustrato

-----  
 $\mu_m = 0.116 \text{ h}^{-1}$   
 $K_S = 0.624 \text{ mM}$   
 $K_i = 1.10 \text{ mM}$   
 $SSQ = 2.821 \cdot 10^{-5}$

Tipo Teissier

-----  
 $\mu_m = 0.0517 \text{ h}^{-1}$   
 $K_S = 0.305 \text{ mM}$   
 $K_i = 3.8988 \text{ mM}$   
 $SSQ = 2.731 \cdot 10^{-5}$

### 6.7.1.2 Influencia del tipo de crecimiento

Para estudiar la incidencia del tipo de crecimiento sobre la utilización de acetato por el alga *Chlorella pyrenoidosa* se han realizado además de los experimentos en condiciones mixotróficas, otros en condiciones anaerobias y fotoheterotróficas, a concentración 1mM en acetato,  $I_0 = 2000$  lux,  $T=30^\circ\text{C}$  y  $\text{pH}=6.5$ , los resultados obtenidos se indican en las Tablas 5.24 y 5.25.

Las velocidades específicas de crecimiento son :

Anaerobio	$\mu = 0.0806 \text{ h}^{-1}$	$r^2 = 0.9833$
Fotoheterotrófico	$\mu = 0.1573 \text{ h}^{-1}$	$r^2 = 0.9903$

La  $\mu$  media obtenida en el crecimiento mixotrófico sobre acetato a 1mM es de  $0.1153 \text{ h}^{-1}$ , todos los valores se pueden considerar dentro del rango normal de variación observada para el crecimiento utilizando como sustrato orgánico glucosa, con lo que se puede llegar a la conclusión encontrada para la misma: en presencia de luz no hay influencia del tipo de crecimiento en la velocidad específica de *Chlorella pyrenoidosa* usando acetato como sustrato orgánico y se obtienen resultados similares a los obtenidos con glucosa.

## 6.7.2 ETANOL

En la actualidad está adquiriendo importancia la utilización de sustratos de grado de reducción elevado en comparación con la biomasa, para la obtención de proteínas (S.C.P).

Dentro de los alcoholes, sustrato reducido, se ha escogido para su estudio el etanol.

La asimilación de un compuesto orgánico reducido se realiza a través de la transformación del mismo, mediante oxidación, a un intermedio de grado de reducción próximo a la biomasa, Minkevich .(1985).

Existe poca información con respecto al crecimiento del alga en alcoholes, y la única información disponible es el trabajo de Endo y col. (1972). Estos autores realizaron experimentos usando *Chlorella regularis* S-50, especie de alta velocidad de crecimiento, a una concentración de 170 mM, obteniendo una velocidad específica de crecimiento de  $\mu = 0.13 \text{ h}^{-1}$  en oscuridad y de  $0,15 \text{ h}^{-1}$  en presencia de luz.

Con *Chlorella pyrenoidosa* en oscuridad creciendo heterotróficamente con alcohol como sustrato no hubo prácticamente crecimiento Delgado (1986).

### 6.7.2.1 Influencia del tipo de crecimiento

A fin de estudiar la incidencia del tipo de crecimiento en *Chlorella pyrenoidosa* se han realizado 3 experimentos en condiciones fotoheterotróficas, mixotróficas y anaerobias, todos a  $T= 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 6.5$ ,  $I_0= 2000 \text{ lux}$  y una concentración de 1mM en Etanol, los resultados de velocidad específica se indican en la tabla siguiente:

## CRECIMIENTO EN ETANOL

T = 30 °C , pH = 6.5 , I<sub>0</sub> = 2000 lux, S<sub>0</sub> = 1mM

Tipo de crecimiento	$\mu, h^{-1}$	r <sup>2</sup>
Fotoheterotrófico	0.1015	0.9962
Mixotrófico	0.1151	0.9920
Anerobio	0.1062	0.9877

De los resultados mostrados en la anterior tabla se deduce que no hay influencia del tipo de crecimiento sobre la velocidad específica de *Chlorella pyrenoidosa* en nuestras condiciones experimentales.

El crecimiento encontrado en presencia de luz parece indicar que este factor induce la síntesis de los enzimas necesarios para el proceso de deshidrogenación que lleva al etanol a transformarse en acetato y entrar en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

En presencia de luz se sintetizan enzimas distintos a los utilizados en oscuridad para la asimilación de un mismo sustrato. Neilson y col. (1974).

Las velocidades específicas de crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* en presencia de luz y usando como sustrato etanol 1mM son del mismo orden que las obtenidas para acetato y para glucosa, por lo que se puede deducir que no hay influencia de la naturaleza de los sustratos estudiados en el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* en presencia de luz.

## 7 CONCLUSIONES

7.1

Como resultado de la investigación de que se da cuenta en esta Memoria se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.- La velocidad específica máxima de crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* en condiciones mixotróficas con glucosa como sustrato orgánico ha resultado independiente de la intensidad de iluminación y de la concentración de sustrato orgánico, en los intervalos investigados de 0.1 a 1 g/L de glucosa y 400 a 2000 lux, teniendo un valor de  $0.103 \text{ h}^{-1}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $\text{pH} = 6.5$  .

2.- Una vez consumido el sustrato orgánico y tras un período de adaptación, las células crecen a velocidades equivalentes a las de un cultivo autotrófico, lo que indica que el período mixotrófico inicial no ha deteriorado de manera irreversible el aparato fotosintético de las células. La comparación de las velocidades específicas de crecimiento en los períodos mixotrófico y autotrófico indica que aunque son superiores las primeras tienden a igualarse al aumentar la intensidad de iluminación, lo que implica que a altas intensidades de iluminación no se obtiene ningún beneficio en el cultivo por la adición de un sustrato orgánico.

3.- Durante el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* en condiciones mixotróficas el contenido de clorofila por unidad de peso seco de células aumenta con el tiempo, alcanzándose los máximos valores cuando el cultivo ha entrado claramente en el período autotrófico de crecimiento al consumirse por completo el sustrato orgánico. Las velocidades específicas de síntesis de clorofila han resultado independientes de la concentración de glucosa, aunque parecen pasar por un

máximo, alrededor de  $I_0 = 1400$  lux, al variar la intensidad inicial de iluminación. Este resultado coincide cualitativamente con las observaciones generales de que el aparato fotosintético de las células es lábil tanto a altas como a bajas intensidades de iluminación.

4.- La velocidad específica de consumo de sustrato orgánico ha resultado ser independiente de la concentración del mismo, aunque aumenta claramente al disminuir la intensidad de iluminación incidente. Este hecho debe ser una respuesta de la célula ante la disminución de la energía luminosa con una mayor utilización metabólica del sustrato orgánico.

Así al disminuir la intensidad de iluminación los valores de  $q_s$  tienden a aproximarse a  $365$  mg glucosa/g biomasa h determinado previamente en nuestro laboratorio en cultivo heterotrófico.

5.- Se ha calculado los rendimientos globales biomasa/sustrato correspondientes a todo el período mixotrófico que resulta depender de la concentración de glucosa y de la intensidad inicial de iluminación en la forma:

$$Y = \frac{\alpha + \beta I_0}{K + I_0}$$

tendiendo a un valor constante  $\alpha/K$  de  $0.33$ , independiente de la concentración de glucosa, a bajas intensidades de iluminación, que coincide prácticamente con el correspondiente al cultivo heterotrófico.

6.- La evolución de los rendimientos instantáneos  $Y_s$ , durante la zona exponencial mixotrófica utilizando los valores determinados por análisis de la concentración de biomasa y sustrato orgánico, pone de manifiesto que éstos son independientes de la concentración de glucosa y aumentan con la intensidad de

iluminación inicial, estando siempre comprendidos entre los valores correspondientes al cultivo heterotrófico de 0.33 y el valor máximo del rendimiento global de 1.24 obtenido altas intensidades de iluminación.

7.- La comparación de los rendimientos instantáneos con las velocidades específicas de consumo de sustrato orgánico pone de manifiesto que en estos casos:

$$q_s < \frac{1}{Y_s} \mu_m$$

aunque ambos términos tienden a igualarse al disminuir la intensidad de iluminación incidente. Este resultado sugiere que en el cultivo mixotrófico la luz no se utiliza solo para el mantenimiento celular sino que también se invierte en la fotosíntesis, de manera mas importante cuanto mayor es la intensidad de iluminación, que se confirma también mediante el estudio estequiométrico de las transformaciones producidas.

8.- La velocidad específica máxima de crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* en condiciones fotoheterotróficas ha resultado independiente de la intensidad de iluminación y de la concentración de sustrato orgánico, teniendo un valor medio de  $0.109 \text{ h}^{-1}$  en los mismos intervalos de las variables investigadas y en las condiciones de operación indicadas en la Conclusión 1. Este valor coincide prácticamente con el correspondiente al cultivo mixotrófico y pone de manifiesto que la posibilidad de fijación fotosintética del  $\text{CO}_2$  no influye sobre la velocidad específica máxima de crecimiento.

9.- Durante el cultivo fotoheterotrófico el contenido en clorofila de las células expresado en tanto por ciento sobre el peso seco no varia con el tiempo ni con las condiciones de operación, siendo su velocidad específica de síntesis



prácticamente constante, independiente de la concentración de sustrato orgánico y de la intensidad inicial de iluminación.

10.- La velocidad específica de consumo de sustrato orgánico durante el cultivo fotoheterotrófico ha resultado apreciablemente superior a la obtenida en condiciones mixotróficas, así para la máxima intensidad de iluminación resulta 120 mg de glucosa/g biomasa h frente a 55 mg glucosa/g biomasa h obtenido, en el cultivo mixotrófico. De acuerdo con este resultado el rendimiento instantáneo durante la zona de crecimiento exponencial resulta de 0.86 g biomasa/g glucosa lo que indica que se cumple prácticamente la igualdad :

$$q_s = \frac{1}{Y_s} \mu_m$$

es decir que en el cultivo fotoheterotrófico la luz se utiliza fundamentalmente para el mantenimiento celular.

11.- En el crecimiento anaerobio de *Chlorella pyrenoidosa* se han utilizado siempre la máxima intensidad inicial de iluminación  $I_0 = 2000$  lux, variando la concentración del sustrato orgánico en el intervalo de 0.1-10 g/L y resultando la velocidad específica máxima de crecimiento constante e igual a  $0.119 \text{ h}^{-1}$ , que coincide prácticamente con el valor obtenido en condiciones fotoheterotróficas y mixotróficas y sugiere que este valor está determinado solo por la posibilidad de utilizar el sustrato orgánico como fuente de carbono y la luz para el mantenimiento celular

12.- Durante el crecimiento anaerobio el contenido en clorofila de las células expresado en tanto por ciento de clorofila sobre peso seco permanece constante, así como la velocidad específica de consumo de sustrato orgánico y el rendimiento instantáneo de este. Sin embargo la comparación de estos dos últimos parámetros pone de manifiesto que en estas condiciones se verifica que:

$$q_s > \frac{1}{Y_s} \mu_m$$

sugiriendo que el sustrato orgánico se invierte también en el mantenimiento celular.

13.- El cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* en presencia del inhibidor de la fotosíntesis DCMU y a la máxima intensidad de iluminación, tanto en condiciones mixotróficas como anaerobias da una velocidad máxima de crecimiento de  $0.073 \text{ h}^{-1}$  independiente de la concentración de sustrato orgánico, apreciablemente inferior al valor medio obtenido anteriormente de  $0.106 \text{ h}^{-1}$  y prácticamente coincidente con el correspondiente al cultivo heterotrófico, lo que indica que la presencia de este inhibidor impide la utilización de la luz tanto para la fotosíntesis como para el mantenimiento celular. Este resultado se confirma con el rendimiento biomasa/sustrato que ha resultado en todos los experimentos muy próximo al valor de 0.33 correspondiente al cultivo heterotrófico.

14.- La influencia del pH sobre la velocidad específica de crecimiento, a la intensidad de iluminación máxima,  $T = 30^\circ\text{C}$  y diferentes concentraciones de glucosa, ha resultado semejante para todos los tipos de crecimiento investigados: mixotrófico, fotoheterotrófico y anaerobio, presentando un valor máximo para pH 6.5 y ajustándose los resultados obtenidos en las proximidades de este óptimo a la ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_o}{1 + \frac{a}{[H^+]} + b[H^+]^2}$$

15.- La influencia de la temperatura sobre la velocidad específica de

crecimiento a la intensidad de iluminación máxima, pH = 6.5 y diferentes concentraciones de glucosa, ha resultado semejante para todos los tipos de crecimiento investigados: mixotrófico, fotoheterotrófico y anaerobio, en el intervalo de 25 a 35 °C presentando un máximo a 30 °C y cuya variación con la temperatura puede representarse de manera aproximada por la ecuación de Moser

$$\mu_m = \mu_a \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) - \mu_d \exp\left(\frac{-E_d}{RT}\right)$$

16.- La utilización de otros sustratos orgánicos en el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* en condiciones mixotrófica, fotoheterotróficas y anaerobias, tales como acetato y etanol, pone de manifiesto que la naturaleza del sustrato orgánico no influye, de manera apreciable, sobre la velocidad específica de crecimiento. Con acetato en cultivo mixotrófico se observa inhibición de sustrato a partir de 1 mM aunque la velocidad específica de crecimiento es mayor que en cultivo heterotrófico y la inhibición se detecta a concentraciones mas altas. Con etanol en concentración 1 mM se produce un crecimiento apreciable, cosa que no ocurre en condiciones heterotróficas, este resultado parece indicar que en presencia de luz se sintetizan los enzimas necesarios para la asimilación de este sustrato

## 9 BIBLIOGRAFÍA

Aiba S. **Biotechnol. Bioeng.** 10; 824 (1968).

Aaronson S., Berner T. y Dubinsky Z. "Microalgae as a source of chemical and natural products". En: **Algae Biomass**. Shelef G. y Soeder C.J. Elsevier North-Holland Biomedical-Press. Amsterdam pp. 575 (1980)

Abeliovich A. "Factors limiting Algal Growth in High Rate Oxidation Pond" En: **Algae Biomass**. Shelef G. y Soeder C.J. Elsevier North-Holland biomedical-Press, Amsterdam pp 205-216 (1980)

Abeliovich A. y Azov Y. Appl. **Environ. Microbiol.** 31, 801 (1976)

Allinger L.N., Cava P.M., De Jongh C.D., Johnson R.C. , Lebel A.N. y Stevens L. "Aminoácidos, Péptidos y Proteínas". En: **Química Orgánica**. Ed. Reverté, Barcelona pp 1073-1089 (1974)

Anderson E.H. **J. Gen. Microbiol.** 28; 297 (1945)

Andrews J.F. **Biotechnol. Bioeng.** 10; 707 (1968)

Andrews G.F. **Biotechnol. Bioeng.** 26; 824 (1984)

Arnon D.I. "Chloroplasts and Photosynthesis" En: **The Photochemical Apparatus: Its Structure and Function**. Brookhaven Natl. Lab. Upton New York. US Atomic Energy Commission Rept. BNL512-(c-28) pp 181. (1958)

Aronoff S. **Plant. Physiol.** 21; 293-409 (1946)

Azov Y, Shelef G. y Moraine R. **Biotechnol. Bioeng.** 24 , 579 (1982a)

- Azov Y., Shelef G. y Narkis N, **Appl. Environ. Microbiol.** 43, 491 (1982b)
- Bailey J.E. y Ollis D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals.** McGraw Hill (1977)
- Barker H.A. **J. Cellular Comp. Physiol.** 7; 73 (1935)
- Becker E.W. **Biomass** 4; 1 (1984)
- Becker E.W. "Nutritional Properties of Microalgae: Potential and Constraints". En: **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**, Richmond ed. CRC Press Boca Raton, Florida, pp 339-419 (1986)
- Ben-Amotz A. y Avron M. "Glycerol,  $\beta$ -Carotene and Dry Algal Meal Production by Commercial Cultivation of *Dunaliella*" En: **Algae Biomass.** Shelef G. y Soeder C.J. Elsevier North-Holland biomedical-Press, Amsterdam pp 603-610 (1980)
- Ben-Amotz A., Sussman I. y Avron M. **Experientia** 23, 38-52 (1982)
- Ben-Amotz y Avron M. **Tibtech** 8, 121-126 (1990)
- Briggs G.E. y Whittingham C.P. **New Phytologist** 51; 236 (1952)
- Bogorad L. "Chlorophylls" En: **Physiology and Biochemistry of Algae.** Lewin R.A.; Academic Press. New York pp 385-408 (1962)
- Borowitzka M.A. "Vitamins and Fine Chemical from Microalgae" En: **Microalgal Biotechnology.** Borowitzka M.A. y Borowitzka L.J. Cambridge Univ. Press, Cambridge pp 153-196 (1988)
- Burlew J.S. "**Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**". J.S. Burlew Carnegie Inst. Washington Pub. 600 (1953)

Calvin **J. Am. Chem. Soc.** **78**; 1895 (1956)

Camacho Rubio F. y Martínez Sancho M<sup>a</sup>. E. **An. Quim.** **78A**, 265 (1983a)

Camacho Rubio F. y Martínez Sancho M<sup>a</sup>. E. **An. Quim.** **79**; 265 (1983b)

Cramer M. y Myers J. **Arch. Mikrobiol.** **17**; 384 (1952)

Chi C.T. y Howell J.A. **Biotechnol. Bioeng.** **18**; 63 (1976)

Chen, P. "Termochemical processing of Microalgae to Improve Methane yields, sanitary engineering" En: Environmental Health Research Laboratory. University of California Repor 6, 1-2 (1987)

Dabes J.N., Fin R.R. y Wilke C.R. **Biotechnol. Bioeng.** **15**; 1159 (1973)

Dan King, Erbes D.L., Ben-Amotz A. y Gibbs M. "The Mechanism of Hydrogen Photoevolution in Photosynthetic Organism". En: **Biological Solar Energy Conversion**. Eds.: Mitsui A., Miyachi S., San Pietro A. y Tamura S. Academic Press pp 69 (1977)

Damaschke K. Z. **Naturforsch.** **12b**; 150-155 (1957)

D'Adamo P.D., Rozich A.F. y Gaudy A.F. **Biotechnol. Bioeng.** **26**; 397 (1984)

Danforth W.F. "Substrate Assimilation and Heterotrophy". En: **Physiology and Biochemistry of Algae**. Lewin R.A.; Academic Press pp 99-119 (1962)

Davis E.A., Dedrick C.S., French C.S., Milner H.W, Myers J., Smith J.H.C y Spoehr H.A. "Laboratory experiments on Chlorella culture at the Carnegie Institution of Washington Department of Plant Biology" En: **Algal Culture from**

Laboratory to Pilot Plant J.S. Burlew Carnegie Inst. Washington Pub. Cap. 9, pp 105-153 (1953)

Diem K. y Lentner C. **Documenta Geigy. Wissenschaftliche Tabellen.** Georg Thieme Verlag. Sttugar (1975)

Delgado Pérez A. "**Crecimiento Heterotrófico de Chlorella Pyrenoidosa**". Tesina Licenciatura. Colegio Universitario de Jaén (1986)

Durand-Chastel, H. "Production and use of Spirulina In México" En: **Algae Biomass.** Shelef G. y Soeder C.J. Elsevier North-Holland biomedical-Press, Amsterdam 51 (1980)

Elchanan S., Bamberger, Dan King, Erbes D.L. y Gibbs M. **Plant. Physiol** 69; 1268-1273 (1982)

Emerson R. y Green L. **Plant Physiol.** 13; 157 (1938)

Emerson R. y Lewis C.M. **Amer. Jour. Bot.** 30; 165 (1943)

Endo H. y Shirota M. **Proc. Int. Ferment. Technol. Symp.** 4 533 (1972)

Endo H., Nakayima K. y Chino R.; **Agr. Biol. Chem.** 38, 9 (1974)

Endo H., Hosoya H. y Koibuchi J. **Ferment. Technol.** 55; 369 (1977a)

Endo H., Sansawa H. y Nakayima K. **Plant and Cell Physiol.** 18; 199 (1977b)

Fisher A.W. Y Burlew J.S. "Nutritional value of microscope algae" "**Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**". J.S. Burlew Carnegie Inst. Washington Pub. pp 303 (1953)



- Forstner U. y Wittman G.T.W. **Metal Pollution in the Aquatic Environment**. Springer Verlag. Berlin (1979)
- Follman H. Markl H. y Vortmeyer **Ger. Chem. Eng.** 1; 335 (1978)
- Fredrickson A.G. **Biotechnol. Bioen.** 18; 1481 (1976)
- Gaffron H. y Rubin J. **J. Gen. Physiol.** 26; 219-240 (1942)
- Gaffron H. ,**Biol. Zentr.** 59; 288-302 (1939)
- Galloway R.A., Rolle I. y Soeder J. **Arch. Hydrobiol.** 73; 1 (1974)
- Genevois L. **Pflanzen. Biochem. Z.** 186; 461-473 (1927)
- Gfeller R.P. y Gibbs M. **Plant Physiol.** 75; 212 (1984)
- Goldman J.C. "Physiological aspects in algae mass culture". En: **Algae Biomass**. Shelef G. y Soeder C.J. Elsevier North-Holland biomedical-Press, Amsterdam pp 343-358 (1980)
- Goldman J.C, Azov Y., Riley C.B y Denn M.R. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol** 57; 1-13 (1982)
- Golueke C.G., Oswald W.J. y Gotaas H.B. **Appl. Microbiol.** 5, 47 (1957)
- Golueke C.G. y Oswald W.J. **Appl. Microbiol.** 7, 219 (1959)
- Griffiths D.J. **Arch. Mikrobiol.** 71; 60 (1970)
- Govindjee R. **Bionergetics of Photosynthesis**. Ed. Academic, New York (1974)

Govindjee y Khanna R. "Bicarbonate :Its Role in Photosystem II". En: **Photosynthetic Oxygen Evolution**. H. Metzner ed. Academic Press. pp 269-282 (1978)

Griffiths D.J. **Arch. Mikrobiol** 71; 60 (1970)

Gibbs M. "Fermentation". En: **Physiology and Biochemistry of Algae**. Lewin R.A.; Academic Press pp 91-97 (1962)

Jones G.L., Jansen F. y Mckay A.J. **J. Gen. Microbiol.** 74; 139 (1973)

Heijnen J.J. y Roels J.A. **Biotechnol. Bioeng.** 23; 739 (1981)

Herman "Photosynthesis and Ultrastructure in Microalgae" En: **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**, Richmond ed. CRC Press Boca Raton,Florida, pp 43-67 (1986)

Hill R., Northcote D.H. y Davenport H.E. **Nature** 172; 948-949 (1953)

Hoare D.S., Ingram L.O., Thurston E.L. y Walkup R. **Archiv. Mikrobiol.** 78; 310 (1971)

Hu W.S., Jeng S.P., Wang H.H. y Cheng-yi Lii **Bull. Inst. Chem. Acad. Sin.** 25; 1-11 (1978)

Hudson B.J.F. y Karis I.G. **J. Sci. Food Agric.** 25; 759 (1974)

Kajan M., LivanskyK., Binova J. Fiser L. y Novotny P. **Archiv. Fur Hydrobiologie suppl.** 93, 93 (1992)

Kaplan D. "Algal Nutrition" En: **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**, Richmond ed. CRC Press Boca Raton,Florida. pp 147-199 (1986)

- Karlander E.P. y Krauss R.W. **Plant. Physiol.** **41**; 1 (1966)
- Keenan J.D. **Energy** **2**, 365 (1977)
- Kessler E. y Mayfarth H. **Ach Mikrobiol.** **37**; 215-225 (1960)
- Komor E. y Tanner W. **Biochem. Biophys. Acta** **241**; 170 (1971)
- Lalucat J., Imperial J. y Pares R. **Biotechnol. Bioeng.** **26**; 677 (1984)
- Lee H. Y., Erickson L.E. y Yang S.S. **Biotechnol. Bioeng.** **26**; 926 (1984)
- Lee H. Y., Erickson L.E. y Yang S.S. **Biotechnol. Bioeng.** **27**; 1640 (1985)
- Lee H. Y., Erickson L.E. y Yang S.S. ;**Biotechnol. Bioeng.** **29**; 832 (1987)
- Lee Y.K., Tan H. y Hew C. **Biotechnol. Bioeng.** **27**; 555 (1985)
- Lee Y.K. y Low C.S. **Biotechnol. Bioeng.** **41**,10; 1003 (1993)
- Lenhinger A.L. "Transporte electrónico y fosforilación fotosintética" En: **Bioquímica**. Ed. Omega. Barcelona pp 599-628 (1979)
- Leveille G.A., Sauberlich J.W. y Shockley J.W. **J. Nutr.** **76**; 423 (1962)
- Linchtenthaler H.K y Pfister H.K. "New Aspects on the Function of Naphthoquinones in Photosynthesis". En: **Photosynthetic Oxygen Evolution**. H. Metzner ed. Academic Press (1978)
- Losada V.M. **Ingeniería Química** ;Febrero; 143-149 (1977)
- Mahadevaswamy M. y Venkataraman L.V. **J. Biosci.** **3**; 349 (1981)

- Makooi M., Reynolds J.T. y Johansen H.W. **Phytochemistry** 15; 367 (1976)
- Markl H. "Modelling of algal production System" En: **Algae Biomass**. Shelef G. y Soeder C.J. Elsevier North-Holland biomedical-Press,Amsterdam pp 361-383 (1980)
- Markovits A., Gianelli M.P., Conejeros R y Erazo S. **World journal of Microbiology and Biotechnology** 9,5; 534 (1993)
- Marre E. "Temperature" En: **Physiology and Biochemistry of Algae**. Lewin R.A. Academic Press. pp 541-549 (1962)
- Martínez S.,M<sup>a</sup>. E. **Tesis Doctoral**. Facultad de Ciencias; Universidad de Granada. (1980)
- Materassi R., Paoletti C., Balloni W. y Florenzano G. "Some Considerations on the production of Lipids Substances by Microalgae and Cyanobacteria" En: **Algae Biomass**. Shelef G. y Soeder C.J. Elsevier North-Holland biomedical-Press,Amsterdam pp 619-626 (1980)
- Mathis P. "Studies of the Donor Side of Photosystem II by Absorption Spectroscopy". En: **Photosynthetic Oxygen Evolution**. H. Metzner ed. Academic Press (1978)
- Meynell G.C. y Meynell E. "Determinación de peso y numero de bacterias" En: **Bacteriologia Experimental. Teoría y Practica**. Ed. Omega, Barcelona pp 13-41 (1969)
- Michels H. **Z. Botan.** 35; 241-270 (1940)
- Milner "The Chemical Composition of Algae" En: **Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**.J.S. Burlew Carnegie Inst.Washington Pub. 600; pp 285-302 (1953)

- Miller L.G. **Anal. Chem.** **31**; 426 (1959)
- Minkevich I.G. **Biotechnol. Bioeng.** **27**; 792 (1985)
- Monod J. "Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes". Herman & Cie. Paris (1942)
- Monod J. **Ann. Inst. Pasteur** **79**; 390 (1950)
- Moser H. "The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat". **Carnegie Institution Publ. No 614** Washington D.C. (1958).
- Moser A. "Rate Equations for Enzyme Kinetics" En: **Biotechnology. H. Brauer Vch** pp 199-226 (1985a)
- Moser A. "Kinetics of Batch Fermentations". En: **Biotechnology. H. Brauer Vch** pp 243-283 (1985b )
- Myers J. **Jour. Gen. Physiol.** **29**; 429 (1946)
- Myers J. "Growth characteristics of algae in relation to the problem of mass culture" En: "**Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**". J.S. Burlew Carnegie Inst. Washington Pub. Capit. 4; pp 37-54 (1953)
- Myers J. **Primary Productivity in the Sea**. P.G. Falkowski Ed. (Plenum, New York) pp 1-447 (1980)
- Nakayama O. Veno T. y Tsuchiya F. J. **Ferment. Technol.;** **52(1)**, 225 (1974)
- Nielsen E.S. **Physiol. Plantarum** **8**; 317 (1955)
- Neilson A.H. y Lewin R.A. **Phycologia** **13**, 227 (1974)

Neish A.C. **Can. J. Botany** **29**; 68 (1951)

Nelson N. **J. Biol. Chem.** **153**; 375 (1944)

Norman I., Bishop, Frick M. y Larry W. Jones "Photohydrogen Production in Green Algae : Water Serves as the Primary Substrate for Hydrogen and Oxigen Production". En: **Biological Solar Energy Conversion**. Eds.: Mitsui A.,Miyachi S.,San Pietro A. y Tamura S.Academic Press pp 3 (1977)

Ogawa T. y Aiba S. **Biotechnol. Bioeng.** **23**; 2185 (1981)

Ohta S., Chang T., Ikegami N., Kondo M. y Miyata H. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **50**, 2, 171 (1993)

Oorschot J.L.P. **Mededel Landbovwhogeschool te Wageningen.** **55**, 225 (1955)

Osterlind S. **Physiol Plantarum** **1**; 170 (1948)

Osterlind S. **Symbolae Bot. Upsal.** **10**, 1 (1949)

Osterlind S. **Physiol Plantarum** **3**; 353 (1950)

Oswald W.J.,Gotaas H.B., Golueke C.G. y Kellen W.R. **Sewage Ind. Wastes** **29**, 437 (1957)

Oswald W.J. y Beneman J.R. "Algal Bacterial System" En: **Biochemical and Photosynthetic aspects of Energy production**. Anthony San Pietro Academic Press. pp 59-79 (1980)

Pawlowsky V. y Howell J.A. **Biotechnol. Bioeng.** **15** 989 (1973)

Pabst W. **Arch. Hydrobiol. Beih. Ergenb. Limnol.** **11**; 65 (1978)

Parson T.R., Stephen K. y Strickland J.D.H. **J. Fish. Res. Board Can.** **8**; 1001 (1961)

Pellizca V. y Howell J.A. **Biotechnol. Bioeng.** **15**; 889 (1973)

Petkov G.D.,Furnadzieva S.T. y Popov S.S. **Phytochemistry** **31**; 4, 1165 (1992)

Phips E.J.,Hansen P. y Velarde T. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **49**, 5, 750 (1992)

Piorreck M., Baasch K. y Pohl P. **Phytochemistry** **23**, 207-216 (1984)

Pirt S.J. "Effects of Temperature" En: **Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientif Publications.** pp 137-145 (1975)

Pirt S.J. **Chem. Ind.** **3**; 843 (1984)

Podojil M., Livansky K., Prokes B. y Wurst M. **Folia Microbiol.** **23**; 444 (1978)

Porra R.J. y Grimme L.H. **Analyst. Biochem.** **57**; 255 (1974)

Powell E.O. "Microbial physiology and continuos culture", pag 24. Powell, Evans, Strange eds. Her Majesty's Stationary Office, Elliot Bros & Yesmar Ltd., Speke Liverpool (1967).

Primo Y.E. "Proteínas de Origen Microbiano" En: **Ingeniería Bioquímica.** Ed. Alhambra pp 27-37 (1980)

Quintero Ramirez R. "Crecimiento Microbiano" En: **Ingeniería Química.** Ed. Alhambra pp 27-37 (1981)

Raven J.A. y Smith F.Y. "The Regulation of Intracellular pH as Fundamental

Biological Process".En: **Ion Transport in Plants**.. Ed. Anderson W.P. Academic Press, N.Y: y London, pp 271-8, (1973).

Raven J.A. " Carbon Dioxide Fixation" En: **Algal Physiology and biochemistry**. Stewart W.D.P. Blackwell Scientific, Oxford pp 434-455 (1974)

Raven J.A. "Photosynthetic Electron Flow and Photophosphorylation" En: **Algal Physiology and biochemistry**. Stewart W.D.P. Blackwell Scientific, Oxford pp 391-412 (1974)

Rodriguez-López M. **Nature** **203**; 666 (1964)

Rodriguez López M. **J. Gen. Microbiol.** **43**; 139 (1966)

Rodriguez López M. **Ingen.Quim. junio**, 139 (1982)

Rose A.H. "Metabolismo Productor de Energía" En: **Microbiología Química**. Ed. Alhambra. pp 211-281 (1977)

Sahu, J. y Adhikary S.P. **Z. All. Mikrobiol.** **21**; 669 (1981)

Samejima H. y Myers J. **J. Gen. Microbiol.** **18**; 107 (1958)

Sánchez S. **Tesis Doctoral**. Dept. Ingeniería Química. Universidad de Granada (1986)

Sawa Y., Kanayama K. y Ochiai H. **Biotechnol. Bioeng.** **24**; 305-315 (1982)

Shamala T.R., Drawert F. y Leupold G. **Biotechnol. Bioeng.** **24**; 1183-1190 (1982a)

Shamala T.R., Drawert F. y Leupold G. **Biotechnol. Bioeng.** **24**; 1287 (1982b)



Shamala T.R., Drawert F. y Leupold G. **Biotechnol. Bioeng.** **24**; 1301-1317 (1982c)

Shugarman P.M. y Appleman D. **Plant. Physiol.** **41**; 1701 (1966)

Soeder C.J. "The scope of microalgae for food and feed" En: **Algae Biomass.** Shelef G. y Soeder C.J. Elsevier North-Holland biomedical-Press, Amsterdam pp 9-21 (1980)

Soeder C.J. **SCP**, University of the Orange Free State Publ. South Africa, Series C. 3; 73-85

Sokolov K. y Anguelov **Acta Biotechnologica** **12**, 6, 475 (1992)

Somogy M. **J. Biol. Chem.** **117**; 771 (1937)

Somogy M. **J. Biol. Chem.** **195**; 19 (1951)

Spoehr, H.A. y Milner H.W. **Plant. Physiol.** **24**, 120 (1949)

Spruit C.J.P. "Photoreduction and Anaerobiosis" En: **Physiology and Biochemistry of Algae.** Lewin R.A.; Academic Press. New York pp 47-60 (1962)

Stanier R.Y. "Autotrophy and heterotrophy in unicellular blue-green algae". En: **The Biology of Blue-Green Algae**, Carr N.G. and Whitton Eds; University of California Press, Berkeley 501 (1973)

Steele J.H. "Microbial Kinetic and Dynamics." En: **Chemical reactor Theory.** Lapidus L. y Amundson N. Eds. Prentice Hall Englewood Cliffs 7; 405-483 (1977)

Sumner J.B. **J. Biol. Chem.** **47**; 5 (1921)

Syrett H.A. y Wong H.A. **Biochem. J.** **89**; 308 (1963)

Szetela R.W. y Winnicki T.Z. **Biotechnol. Bioeng.** **23**; 1485 (1981)

Tamiya H., Hase E., Shibata K., Mituya A., Iwamura T., Nihei T. y Sasa T. "Kinetics of Growth of Chlorella with special reference to its Dependence on quantity of Available Light and on Temperature". En: **Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**. J.S. Burlew Carnegie Inst. Washington Pub. 16; 204-232 (1953)

Teissier G. **Ann. Physiol. Physiochim. Biol.**; **12**, 527 (1936)

Tipnis, H.P. y Prat R. **Nature** **188**; 1031 (1960)

Trubachev, N.I., Gitel'zon I.I., Kalacheva G.S., Barashkov V.A., Belyanin V.N. y Andreeva R.I. **Prikl. Biokhim. Mikrobiol.** **12**; 196 (1976)

Tseng M.C. y Wayman M. **Biotechnol. Bioeng.** **21**; 994 (1975)

Vonshak A., Guy R. **Plant Cell and Environment.** **15**, 5, 613 (1992)

Warburg W.E. **Die Naturwissenschaften** **39**; 337 (1952)

Warburg, O. y Negelein, E. **Z. Physik. Chem.** **106**, 191-218 (1923)

Webb J.L. "Enzyme and Metabolic Inhibitors" vol 1; Academic Press. New York (1963)

Yano T., Nakahara T., Kamiyana S. y Yamada K.; **Agric. Biol. Chem.** **30**, 142 (1966)

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de la fecha, constituido por:

- D. ANTONIO GARCIA RODRIGUEZ.
- D. EMILIO MOLINA GRIMA.
- D. SEBASTIAN SANCHEZ VILLASCLARAS.
- D. VICENTE BRAVO RODRIGUEZ.
- D. JOSE MANUEL JIMÉNEZ CASTILLO.

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don JUÁN BAUTISTA ESPINOLA LOZANO.

se acordó por UNANIMIDAD otorgar la calificación de APTO "CUM LAUDE".

y para que conste, se extiende firmada por los componentes del Tribunal, la presente diligencia.

Granada, a 7 de JULIO de 1994.

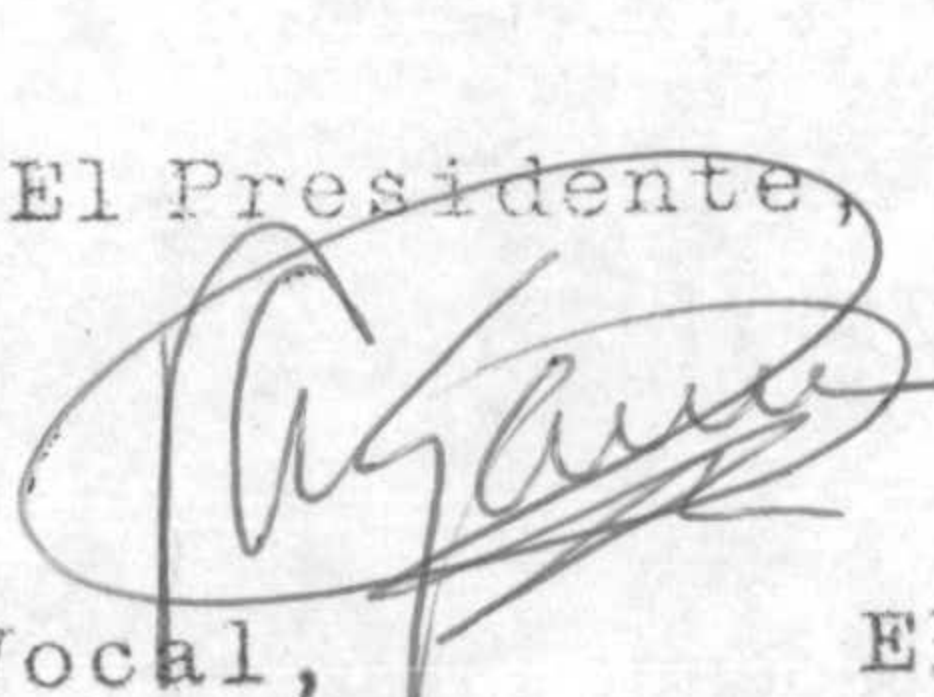
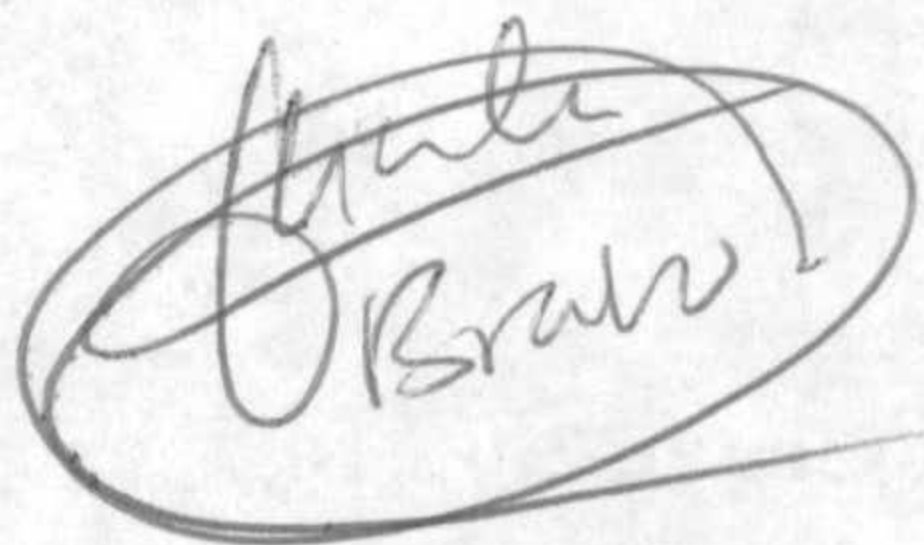
El Secretario,


El Presidente,

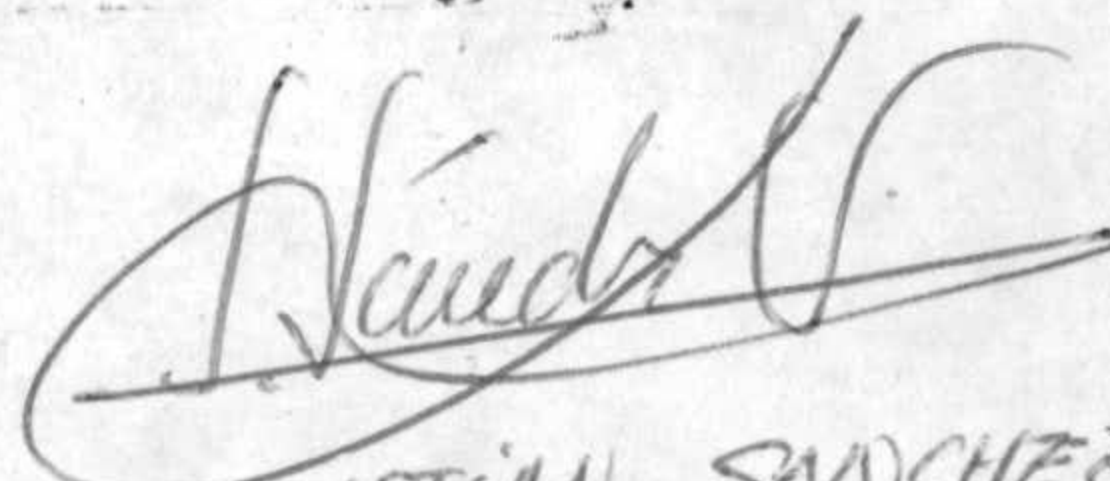
El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

  
Emilio Molina Grima

  
SEBASTIAN SANCHEZ VILLASCLARAS